

KOHOTETUN LÄMPÖTILAN JA KOHOTETUN OTSONIN VAIKUTUKSET KUUSEN (*Picea abies*) NEULASANATOMIAAN JA VOC-PÄÄSTÖIHIN

Hanna Valolahti

Kohotetun lämpötilan ja kohotetun otsonin vaikutukset
kuusen (*Picea abies*) neulasanatomiaan ja VOC-päästöihin

Pro Gradu -tutkielma

Ympäristötiede

Itä-Suomen yliopisto, Ympäristötieteen laitos

helmikuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Ympäristötiede

Hanna Valolahti: Kohotetun lämpötilan ja kohotetun otsonin vaikutukset kuusen (*Picea abies*) neulasanatomiaan ja VOC-päästöihin

Pro Gradu -tutkielma 47 sivua, 2 liitettä (49 sivua)

Tutkielman ohjaajat: Minna Kivimäenpää, Toini Holopainen
helmikuu 2012

avainsanat: VOC-yhdisteet, neulasanatomia, mikroskopia, otsoni, lämpötila, kuusi

TIIVISTELMÄ

Ilmasto tulee nykyisten mallien mukaan muuttumaan kiihtyvällä tahdilla. Kasvillisuuden kannalta merkittävimpiä muutoksia ovat todennäköisesti globaali lämpötilan kohoaminen sekä alailmakehän haitallisen otsonin pitoisuuksien kasvu. Sekä kuumuus että korkea otsonipitoisuus aiheuttavat kasveille stressiä, mikä lisää nykytietämyksen mukaan kasveista indusoituvien, kasvihuonekaasuiksi luokiteltavien ja ilmakehässä reaktiivisten VOC-yhdisteiden määrää.

Kokeellisessa osiossa haluttiin selvittää, vaikuttaako kohonnut otsonipitoisuus ja/tai lämpötila kuusen VOC-päästöihin tai pyrkiikö kasvi sopeutumaan näihin muutoksiin muokkaamalla lehtirakennettaan. Täysin vastaavanlaista tutkimusta ei oltu aikaisemmin kuusilla tehty. Kolmivuotiaat, siemenalkuperäiset kuusentaimet altistettiin 1,4 -kertaiselle otsonipitoisuudelle ja hieman yli +1 °C:n lämpötilan kohotukselle vallitsevaan tasoon nähden. Kaksi vuotta kestäneen altistuksen jälkeen taimista tutkittiin VOC-emissiot kaasukromatografimassaspektrometrillä ja neulasanatomiaa mahdollisesti tapahtuneet muutokset valo- ja pyyhkäisyelektronimikroskooppilla. Tulokset analysoitiin tilastollisin menetelmin.

Tulosten perusteella jo varsin alhaisella lämpötilan kohoamisella havaittiin olevan vaikutuksia neulasanatomiaan. Rakenteessa tapahtuneet muutokset viittasivat mesomorfinen rakenteen muodostumiseen, joka on tyypillinen kasveilla, jotka ovat tottuneet hyviin vesiolosuhteisiin ja lämpimään. Lämmityskäsittelyssä ilmarakorivien lukumäärä neulasessa laski, mutta ilmarakojen lukumäärään /mm² käsittelyillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä vaikutuksia. Altistuminen kohotetulle otsonille puolestaan paksunsi epidermi- ja hypodermikerroksia, mikä voi olla merkki rakenteellisen suojamekanismin muodostumisesta. VOC-emissioissa sekä lämpötilan että otsonin kohottaminen aiheuttivat muutoksia lähinnä yksittäisten yhdisteiden emissiomäärissä, ei niinkään yhdisteiden kokonaistuotannossa. Muutamien yhdisteiden kohdalla otsoni- ja lämpötilakäsittelyjen välillä oli havaittavissa interaktioita käsittelyiden vaikuttaessa toisiinsa.

Tämän perusteella kuusi reagoi jo matalaan lämpötilan tai otsonipitoisuuden kohottamiseen muuttamalla neulasen rakennetta. VOC-yhdisteiden kokonaistuotannossa ei tapahtunut kokeessa käytetyillä altistetasoilla merkittäviä muutoksia, mutta muutamien yksittäisten yhdisteiden määrissä oli havaittavissa käsittelyiden aiheuttamia muutoksia. Erittäin reaktiivisten seskviterpeenien kohdalla otsoni- ja lämmityskäsittelyn välinen emissioita lisäävä interaktio voi olla tulevaisuudessa kuitenkin merkityksellinen, joten lisätutkimusta matalilla altistustasoilla tapahtuvista muutoksista tarvittaisiin.

ESIPUHE

Tämän Pro gradu –tutkielman kokeellinen osuus suoritettiin osana tutkintoon kuuluvaa harjoittelua Itä-Suomen yliopiston (silloinen Kuopion yliopisto) Ympäristötieteen laitoksella ja sille kuuluvalla Ruohoniemen koekentällä vuoden 2010 kesän ja syksyn aikana. Koe oli osa pidempään kestänyttä projektia, jonka tarkoituksena oli tutkia otsonin ja lämpötilan vaikutuksia metsäpuihin käyttäen matalia kohotustasoja kuvaamaan realistista muutosta tulevaisuuden ilmastossa.

Kiitokset tämän gradun valmistumisesta kuuluvat ensinnäkin pääohjaajalleni Minna Kivimäenpäälle, joka jaksoi aina neuvoa ja opastaa sekä käytännön tehtävissä että kirjallisen tutkielman valmistelussa ja toiselle ohjaajalleni Toini Holopaiselle, jonka projektiin harjoittelupaikka kuului ja joka tätä kautta mahdollisti tämän tutkielman syntymisen; lisäksi Anne-Marja Nergille, joka suostui nopealla aikataululla gradun tarkastajaksi omista kiireistään huolimatta.

Kiitokset kuuluu myös Timo Oksaselle ja Juhani Tarhaselle laitteiden kunnossapidosta ja käyttöavusta silloin, kun oma tekninen osaaminen loppui; SIB-laboratorion (ent. BioMater-keskus) henkilökunnalle valomikroskooppipreparaattien valmistuksesta; Itä-Suomen yliopistollisen puutarhan henkilökunnalle koekentän ylläpidosta ja neuvoista monien käytännön asioiden kanssa – erityiskiitokset Elina Häikiölle, Marjatta Puuruselle ja Toivo Kuroselle; Jaana Rissaselle ja Virpi Tiihoselle reagenssien valmistuksesta ja avusta laboratoriotyöskentelyssä.

Lisäksi erityismaininta Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistykselle, joka myönsi tämän gradun tekemiseen Yhdistetyn Rahaston Kasvivaurioapurahan vuonna 2011. Kiitos.

SISÄLTÖ

| | |
|---|----|
| JOHDANTO..... | 4 |
| 1. KIRJALLISUUSKATSAUS | 7 |
| 1.1 VOC-YHDISTEET | 7 |
| 1.2 LÄMPÖTILAN KOHOAMINEN | 9 |
| 1.2.1 Lämpötilan kohoamisen vaikutukset kasvianatomiaan | 10 |
| 1.2.2 Lämpötilan kohoamisen vaikutus VOC-emissioihin | 11 |
| 1.3 OTSONI | 13 |
| 1.3.1 Alailmakehän otsoni | 13 |
| 1.3.2 Alailmakehän otsonin vaikutukset kasvianatomiaan ja VOC-emissioihin | 15 |
| 2. KOKEELLINEN OSUUS | 17 |
| 2.1 TYÖN TAVOITTEET | 17 |
| 3. AINEISTO JA MENETELMÄT | 18 |
| 3.1. KOEJÄRJESTELY | 18 |
| 3.2 MENETELMÄT | 21 |
| 3.2.1 VOC-yhdisteiden keräys..... | 21 |
| 3.2.2 GC-MS – analyysi | 23 |
| 3.2.3 Valomikroskopia | 26 |
| 3.2.4 Pyyhkäisyelektronimikroskopia | 29 |
| 3.3. TILASTOLLISET ANALYYsit | 30 |
| 4. TULOKSET | 31 |
| 4.1. VOC-YHDISTEET | 31 |
| 4.2 VALOMIKROSKOPIA | 35 |
| 4.3 PYYHKÄISYELEKTRONIMIKROSKOPIA | 36 |
| 5. TULOSTEN TARKASTELU | 36 |
| 5.1. VOC-YHDISTEET | 37 |
| 5.1.1 Mahdollisia virhelähteitä VOC-emissioiden määrittämisessä | 38 |
| 5.2. NEULASANATOMIA..... | 40 |
| 5.2.1 Mahdollisia virhelähteitä mikroskopiaan liittyen | 41 |
| 6. JOHTOPÄÄTÖKSET | 42 |
| LÄHTEET..... | 44 |

JOHDANTO

Globaalisti muuttuvassa ilmastossa kasvit joutuvat jatkuvasti sopeutumaan uusiin olosuhteisiin. Tähän ilmaston muuttumiseen liittyvät vuotuisten keskilämpötilojen kohoaminen, hiilidioksidin, alailmakehän otsonin ja muiden kasvihuonekaasujen pitoisuuden jatkuva lisääntyminen ilmakehässä sekä sään ääri-ilmiöiden, kuten alueellisen kuivuuden, voimakkaiden tuulien ja rankkasateiden yleistyminen. Osa muutoksista on kasvien kannalta ainakin jossain määrin hyödyllisiä, osa taas selkeän haitallisia. Suomi sijaitsee maantieteellisesti sellaisella alueella, jossa nykyisten arvioiden mukaan varsinkin vuotuisten keskilämpötilojen muutokset tulevat olemaan keskiarvoja korkeampia. Koska Suomessa noin 75 % maapinta-alasta on metsien peittämää (Forest.fi), on tärkeää selvittää, kuinka muutokset tulevat tulevaisuudessa vaikuttamaan luontoomme. Metsät tarjoavat paitsi tärkeän elinkeinon, myös korvaamattomat elinympäristöt tuhansille eliölajeille.

Maapallolla vallitseva ilmasto ei ole koskaan ollut stabiili, vaan siinä tapahtuu pitkällä aikavälillä tarkasteltaessa hitaita muutoksia. Maan omat prosessit sekä asema ja etäisyys aurinkoon nähden ovat vuorotellen jähdyttäneet ja lämmittäneet ilmakehää. Viimeisen sadan vuoden aikana ilmasto on alkanut lämmetä kiihtyvällä tahdilla, lähinnä ihmistoiminnan vaikutuksesta. Maapallon keskilämpötila on riippumattoman ilmastopaneelin IPCC:n asiantuntijoiden mukaan noussut noin 0,74 °C viimeisen sadan vuoden aikana ja lämpenemisen arvioidaan tulevaisuudessa kiihtyvän entisestään. Monimuuttujaisten ilmastomallinnusten mukaan vuoteen 2100 mennessä keskilämpötilat tulevat nousemaan globaalisti keskimäärin 2 - 4 °C (IPCC 2007).

Ilmasto ei lämpene tasaisesti maapallolla, vaan suurimpien muutosten oletetaan kohdistuvan pohjoiselle pallonpuoliskolle, sitä voimakkaampina, mitä lähempänä napa-aluetta ollaan. Suomessa talvilämpötilojen nousun arvioidaan olevan jopa +6 °C ja kesälämpötilojen +4 °C (Kellomäki ym. 2008). Pohjoisella pallonpuoliskolla ei ole yhtä laajoja merialueita tasaamassa lämpötilavaihteluja kuin eteläisellä ja toisaalta mantereen suurilla, yhtenäisillä metsäalueilla on oma, mahdollisesti kiihdyttävä vaikutuksensa ilmastomuutokseen. Lisäksi Euroopassa on runsaasti päästöjä aiheuttavaa teollisuutta sekä liikennettä. Näitä ihmistoiminnasta johtuvia, ilmastomuutosta

kiihdyttäviä päästöjä pyritään hillitsemään erilaisin kansallisin ja kansainvälisin päästörajoituksin ja sakoin sekä ohjaamalla kehittyneemmän teknologian käyttöön varsinaisen prosessin aikana ja päästöjä puhdistettaessa. Liikenteessä pyritään rajoittamaan ilmastoa lämmittävien kasvihuonekaasujen syntymistä katalysaattoreilla, puhtaammilla polttoaineilla sekä alueellisin toimin, joissa mekaanisten hiukkaspäästöjen syntymistä pyritään ehkäisemään nopeus- ja rengasrajoituksin (Engardt ym. 2009).

Kasvihuonekaasuja vapautuu ilmakehään paitsi ihmisen toiminnan tuloksena, myös luonnollisista päästölähteistä. Salamointi ja erilaiset maaperän toiminnot tuottavat typen oksideja (NO_x) ja metaania (NH_4), meristä haihtuva vesi jää vesihöyryksi ennen pilvien ja sateen muodostumista. Vihreät kasvit sitovat hiilidioksidia yhteyttämisessä, mutta toisaalta ne vapauttavat tuottamiaan hiiliyhdisteitä ilmaan. Nämä VOC-yhdisteet (sanoista *volatile organic compound*, haihtuva orgaaninen yhdiste) ovat lyhytikäisiä, mutta ilmakehässä reaktiivisia ja ne voivat toimia sopivissa olosuhteissa prekursoreina esimerkiksi alailmakehän haitallisen otsonin muodostumiselle. Alailmakehässä oleva otsoni (Hartikainen ym. 2009) ja lämpötilan kohoaminen (Constable ym. 1999) voivat taas osaltaan lisätä kasvien VOC-yhdisteiden tuotantoa muodostaen näin katkeamattoman noidankehän. Näiden biogeenisten eli luonnollisista lähteistä peräisin olevien VOC-yhdisteiden olemassaolo on tunnettu jo pidempään, mutta vasta viime vuosikymmeninä on herännyt kiinnostus tutkia niiden fysikaalis-kemiallisia vaikutuksia ilmakehässä. Reaktiivisuutensa vuoksi VOC-yhdisteillä voi olla hyvinkin merkittävä rooli ilmakehän sekundaaristen orgaanisten aerosolien muodostajina ja sitä kautta vaikutus pilvisyyden muodostumiseen, lämpötilan kehittymiseen ja maan pinnan saavuttavan säteilyn määrään.

Kasvillisuuden kannalta kohoava lämpötila mahdollistaa puurajan siirtymisen yhä pohjoisemmille alueille. Pidentynyt kasvukausi lisää yleisesti biomassatuotantoa ja nopeuttaa kasvua, mikä hyödyttää sekä viljelykasvien satoisuuden parantumisenä että metsätaloudessa hakkuukierron nopeutumisena. Puuston sopeutuminen muuttuvaan ilmastoon on erityisen tärkeää Suomessa, joka on Euroopan metsäisin maa ja perinteinen metsätalousvaltio, ja jonka viennistä iso osa perustuu edelleen puutavaraan. Maantieteellisesti Suomi kuuluu pohjoiseen havumetsävyöhykkeeseen ja pinta-alasta noin 75% on metsää. Kuusi (*Picea abies*) on Suomen toiseksi yleisin metsäpuulaji, joka

on valtalajina 24% metsistä (forest.fi). Näin ollen sillä on selkeä ekologinen ja toisaalta metsätaloudellinen merkitys. Kuusen on kuitenkin arveltu olevan Suomen metsien häviäjäpuulaji ilmaston lämmetessä, sen suhteellisen osuuden arvioidaan laskevan reiluun neljännekseen nykytilanteesta vuoteen 2100 mennessä (Kellomäki ym. 2008).

Tämän Pro gradu -tutkielman aiheena oli perehtyä alailmakehän kohoavan otsonipitoisuuden ja lämpötilan kohoamisen aiheuttamiin muutoksiin nuorten kuusentaimien VOC-tuotannossa sekä neulasanatomiassa. Otsonin ja lämpötilan vaikutuksia kasvuun, VOC-päästöihin ja kasvin fysiologiaan on aiemmin tutkittu lähinnä lehtipuilla. Tutkielma koostuu kirjallisuuskatsauksesta ja kokeellisesta osiosta, joka on tehty Itä-Suomen yliopiston Kuopion kampuksen ympäristötieteen laitokselle kuuluvalla Ruohoniemen koekentällä kesällä 2010 osana laajempaa tutkimusta.

Alailmakehän otsonipitoisuuden kohoaminen ja lämpötilan nousu ovat molemmat ilmaston muuttumiseen sidonnaisia asioita, mutta toisaalta ne ovat vain osa koko totuudesta. Täydellinen ilmastonmuutoksen kasvillisuusvaikutusten mallintaminen on käytännössä mahdotonta lukemattomien muuttuvien tekijöiden vuoksi. Tämän vuoksi tässä tutkielmassa olisi väärin puhua "ilmastonmuutoksen mukanaan tuomista" vaikutuksista, kun tarkastelun kohteena on kohonneen otsonipitoisuuden sekä lämpötilan aiheuttamat muutokset nuorissa kuusissa. Ilmastonmuutos on kuitenkin ollut niin voimakkaasti taustavaikuttajana tutkimuksessa, johon gradun kokeellinen osuus liittyy, että olisi yhtä lailla väärin ohittaa aihe täysin. Kirjallisuuskatsauksessa rajaan kaiken tarkastelun kuitenkin otsonin ja lämpötilan puille aiheuttamiin vaikutuksiin.

1. KIRJALLISUUSKATSAUS

1.1 VOC-YHDISTEET

VOC-yhdisteet ovat orgaanisia hiiliyhdisteitä, joita muodostuu sekä luonnollisista lähteistä, että ihmistoiminnan seurauksena teollisuuden ja liikenteen päästöistä. Näiksi haihtuviksi orgaanisiksi yhdisteiksi voidaan luokitella käytännössä hiilidioksidia ja hiilimonoksidia lukuun ottamatta kaikki muut ilmakehässä esiintyvät, hiiltä sisältävät yhdisteet (Kesselmeier & Staudt 1999). Kyseessä on ominaisuuksiltaan, molekyylipainoiltaan ja pysyvyydeltään varsin heterogeeninen joukko hyvin erilaisia yhdisteitä, joiden ryhmittelyä voidaan tehdä joko syntylähteeseen (mikrobien tuottamat, antropogeenisista lähteistä olevat tai kasveista indusoituvat VOC-yhdisteet), kemialliseen rakenteeseen tai terveydelle haitallisuuteen perustuen. Tässä tutkielmassa käytän myöhemmin jakona kemialliseen rakenteeseen perustuvaa ryhmittelyä, joka erittelee monoterpeenit, seskviterpeenit, GLV-yhdisteet (*green leaf volatiles*) sekä isopreenin omiksi ryhmikseen.

Kasvien merkitys VOC-yhdisteiden tuottajina on huomattava, globaalisti jopa noin 2/3 ilmakehään päätyvistä haihtuvista orgaanisista yhdisteistä arvioidaan olevan peräisin kasvillisuudesta (Guenther 1997). Boreaalinen havumetsävyöhyke on laajuutensa vuoksi maailman toiseksi suurin yhtenäinen haihtuvien orgaanisten yhdisteiden luonnollinen syntylähde päiväntasaajan sademetsien jälkeen. Biogeenisten VOC-yhdisteiden tuotanto on sidoksissa lämpötilaan, valon määrään ja viime kädessä fotosynteesiin, joten boreaalisella alueella niiden tuotanto on painottunut voimakkaasti kesäaikaan. VOC-yhdisteet toimivat kasveilla hormoneina, sekundaarimetabolian ylijäämätuotteina sekä signaali-, puolustus- tai houkutusaineina (Goldstein & Galbally 2007). Jokainen kasvilaji tuottaa erilaisen yhdistelmän mono-, ja seskviterpeenejä sekä isopreenia.

Yleisimmät kasvillisuuden emittoimat VOC-yhdisteryhmät ovat isopreeni ja monoterpeenit, joiden osuus kaikista ilmakehään joutuvista biogeenisista haihtuvista yhdisteistä on arviolta noin 80 % (Laffineur ym. 2011). Suomessa monoterpeenien osuus biogeenisista VOC-yhdisteistä on 45 %, isopreenin osuuden ollessa huomattavasti vähäisempi, vain noin 7 %. Yksi syy monoterpeenien suureen osuuteen on Suomen havupuuvaltaiset metsät. Kuusi ja mänty ovat molemmat

monoterpeenien emittoijia ja enemmän isopreeniä tuottavien lehtipuiden osuus on täällä vähäisempi (Räisänen ym. 2008). Hemiterpeenien ryhmään kuuluva isopreeni (C_5H_8) on kaikkein yleisin ja siten myös tutkituin biogeeninen VOC-yhdiste. Sen hajoamisaika ilmakehässä on päiväaikaan kolme tuntia, yöllä noin puolet siitä. Isopreenin pitoisuus ilmakehän koostumuksesta vaihtelee muutamista biljoonasosista (ppt) miljardisosiin (ppb) (Kesselmeier & Staudt 1999).

Monoterpeenejä on ilmakehässä suunnilleen yhtä paljon kuin isopreenia. Kymmenhiiliset monoterpeenit ovat muodostuneet kahdesta isopreeniyksiköstä, seskviterpeeneissä on vastaavasti kolme yhteen liittynyttä isopreeniyksikköä. Monoterpeenit hajoavat ilmakehässä hieman isopreeniä nopeammin, yhdisteen kestoajan vaihdellessa muutamasta tunnista alle viiteen minuuttiin. Kamfeeni, bornyyliasetaatti ja borneoli ovat ilmakehässä täysin inerttejä eivätkä siten vaikuta ilmakehän fysikaalisiin ominaisuuksiin (Hatfield & Huff Hartz 2011). Raskaammat seskviterpeenit hajoavat ilmakehässä muutamissa minuuteissa (Kesselmeier & Staudt 1999). Ne ovat monoterpeenejä reaktiivisempia ja siksi niiden merkitys ilmakehän koostumuksen kannalta on huomattava, vaikka kasvit eivät tuotakaan niitä yhtä paljon kuin monoterpeenejä tai isopreenia (Guenther 1997). Seskviterpeenit reagoivat muun muassa hydroksyyliiradikaalien sekä alailmakehän otsonin kanssa ja niiden kyky reagoida alailmakehän typen oksidien kanssa muodostaen edelleen haitallista otsonia on tunnettu jo 1950-luvulta lähtien (Hakola ym. 2006, Räisänen ym. 2008, Goldstein & Galbally 2007).

Monet VOC-yhdisteistä tuotetaan pääasiassa kloroplasteissa ja tuotantoprosessi on voimakkaasti yhteydessä fotosynteesiin ja sen aktiivisuuteen (Aaltonen ym. 2011). Haihtuvien orgaanisten yhdisteiden tuotantoon voimakkaimmin vaikuttavat tekijät ovat nykytietämyksen mukaan lämpötila ja valon määrä (Guenther ym. 1993, Aaltonen ym. 2011). Kasvin kehitysaste, ilmansaasteet ja niiden aiheuttama stressi sekä erilaiset vauriot kasvissa vaikuttavat myös tuotettuihin VOC-yhdisteiden määriin, osa niiden tuotantoa lisäävästi, osa taas sitä vähentäen (Kesselmeier & Staudt, 1999). Yleisesti VOC-yhdisteiden tuotanto ja vapautuminen ilmakehään tapahtuvat kasveilla *de novo*, mutta poikkeuksellisesti havupuut kykenevät varastoimaan VOC-yhdisteitä muun muassa pihkatiehyisiin. Kuusen emittoimista VOC-yhdisteistä vain noin 33,5 % on *de novo* -synteesissä tuotettuja (Ghirardo ym. 2010).

Yleisesti ilmastomuutoksen myötä kohoavan lämpötilan arvellaan tulevaisuudessa lisäävän VOC-yhdisteiden tuotantoa, millä voi olla ennalta arvaamattomia vaikutuksia. VOC-yhdisteiden lisääntyminen paitsi muuttaa ilmakehän koostumusta, se voi myös toimia ilmastomuutosta kiihdyttävänä tai inhihoivana tekijänä. Koska myös kasvin kokema stressitila lisää monessa tapauksessa VOC-yhdisteiden tuotantoa, ilmastomuutoksen myötä kohonneet lämpötila- ja otsonitasot voivat vielä entisestään kiihdyttää muutosta.

1.2 LÄMPÖTILAN KOHOAMINEN

Suomessa lämpenevä ilmasto tulee ilmastomallien mukaan siirtämään tulevaisuudessa puurajaa yhä pohjoisemmaksi tehollisen kasvukauden pidentyessä. Puulajeista koivun levinneisyys laajenee pohjoisimmille alueille, ja muidenkin puulajien menestyminen aikaisempaa pohjoisemmassa paranee. Metsien vuotuinen kokonaisbiomassatuotanto lisääntyy, osittain metsäalueiden luontaisen laajenemisen ja osittain lämpenemisen sekä muiden ilmastollisten muutosten aiheuttaman yksittäisen puuyksilön tehostuneen kasvun vuoksi (Kellomäki ym. 2008). Kuumuuden ja kuivuuden siedossa on kuitenkin runsaasti eroa puulajien ja jopa saman lajin eri puuyksilöiden välillä, minkä vuoksi lämpötilan vaikutuksia pitäisikin tarkastella ennemmin lajikohtaisesti. Lisäksi ilmaston lämpenemiseen liittyy suorasti ja epäsuorasti muutoksia muissa sääilmiöissä, sillä lämpötila vaikuttaa alueen tuulisuuteen, pilvisyyteen, kuivuuteen, sateiden muodostumiseen alueella sekä metsäpaloihin. Näin ollen lämpötilan kohoamisella voi olla lopulta vaikeasti ennakoitavia vaikutuksia puiden menestymiseen.

Kuivien jaksojen lisääntyminen ja piteneminen suosii mäntyä koko maassa. Sen sijaan lämpötilamuutoksille herkempi kuusi, jonka osuus tällä hetkellä on n. 43 % Suomen metsäpinta-alasta, tulee taantumaan osuuden ollessa vuoden 2100 tienoilla enää n. 12 %. Ilmastotarkastelua ja siihen liittyvää tilastointia tehdään 30 vuoden ajanjaksoissa ja jo viimeisimmällä tarkastelujaksolla

1961 - 1991 kuusen kokonaisbiomassatuotannon yleinen kehitys oli hyvin vähäistä tai se oli joillain alueilla jopa taantunut aikaisempiin tarkastelujaksoihin verrattuna (Kellomäki ym. 2008).

Ilmaston lämmitessä talvet jäävät lyhyemmiksi ja suojaava lumipeite ohuemmaksi tai sitä ei muodostu ollenkaan. Maaperän jatkuva vuorottainen jäätyminen ja sulaminen voivat vaurioittaa puiden juuria aiheuttaen ongelmia talvesta selviytymisessä. Syksyinen talveentumisprosessi voi häiriintyä ja keväällä liian aikainen kasvun aloittaminen lisää riskiä altistua herkässä silmujen avautumisen vaiheessa kevään viimeisille yöpakkasille (Wieser ym. 2009). Pohjoisilla alueilla kasvien kasvu ei kylmyyden ja talvikuukausien riittämättömän auringon säteilyintensiteetin vuoksi ole ympärivuotista, vaan rajoittuu ajanjaksoon, jolloin vuorokauden keskilämpötilat ylittävät +5 °C astetta. Tämä kasvukausi on nykyisellään eteläisessä Suomessa noin 180 vuorokautta ja pohjoisessa noin 120 vuorokautta. Kuopiossa kasvukausi kesti kesällä 2010 Ilmatieteen laitoksen mukaan toukokuun 9. päivästä lokakuun 10. päivään eli yhteensä 155 vuorokautta.

1.2.1 Lämpötilan kohoamisen vaikutukset kasvianatomiaan

Kasvukauden pidentyessä kasvin maanpäällisen osan biomassatuotanto lisääntyy monilla lajeilla (Sallas ym. 2003) lämpötilan kohoamisen nostaessa nettofotosynteesiä optimitasolle saakka ja tehostaessa hiilen sidontaa. Biomassatuotanto lisääntyy enemmän lehtipuilla (Mäenpää ym. 2011).

Lämpötilan kohoaminen, varsinkin yhdistettynä kuivuuteen, lisää veden haihtumista sekä maaperästä että kasveista itsestään. Transpiraatiota eli veden haihtumista kasvin ilmarakojen kautta tapahtuu enemmän, jolloin kasvi joutuu pitämään ilmarakojaan enemmän suljettuina säästääkseen vettä. Kohotetussa lämpötilassa kasvaneilla puilla ilmarakojen kokonaismäärän on havaittu vähenevän, niiden sijainnin painottuneen enemmän neulasen alalaidalle ja koon pienenevän (Luomala ym. 2005). Ilmarakojen sulkeminen ja niiden läpäisevyyden heikkeneminen kuitenkin vähentää tai estää yhteyttämisessä tarvittavan CO₂:n sisäänottoa, jolloin fotosynteesin teho laskee. Tätä kompensoidakseen kasvi joutuu tehostamaan jonkin verran hiilidioksidin

sisäänottomekanismeja (Klingenberg ym. 2010). Hiilidioksin riittävyyden kannalta jatkuva ilmakehän hiilidioksidipitoisuuden nousu (IPCC 2007) on kasveille positiivinen muutos.

Havupuilla tehdyissä kokeissa kohotetun lämpötilan on havaittu stimuloivan meristeemisolukon kasvua ja soluelinten määrän lisääntymistä. Toisaalta varsinainen aktiivinen kasvuvaihe lyheni, jolloin yksittäiset soluelimet jäivät pienemmiksi (Sallas ym. 2003). Lämpimässä kasvaneet, ensimmäisen vuoden neulaset jäivät kapeammiksi kuin kontrollipuissa alalaidan mesofyllisolukkerroksen jäädessä ohuemmaksi ja keskuslieriön johto- eli vaskulaarisolukon pienemmäksi. Johtosolukon suhteellinen osuus muihin kerroksiin verrattuna ei kuitenkaan muuttunut (Luomala ym. 2005). Yksittäisen neulasen koon pienenemisellä ei kuitenkaan näyttänyt olevan vaikutusta neulasten kokonaisbiomassaan kontrollipuiden ja kohonneessa lämpötilassa kasvaneiden välillä. Kohotetussa lämpötilassa kasvaneiden neulasten materiaali- ja rakennetiheydessä tapahtuu muutoksia, jotka kompensoivat koon ja biomassan suhteen eroja. Tiheyden kasvuun vaikuttaa tärkkelyksen kertyminen, suojaavien soluseinämien paksuuntuminen, soluvälitilan osuuden väheneminen sekä lignifikaation ja nilan muodostumisen lisääntyminen (Luomala ym. 2005). Lämpötilan kohoaminen lisää myös havupuun varastoiman pihkan kokonaismäärää ja siinä olevien, diterpeeneihin kuuluvien hartsihappojen konsentraatiota (Sallas ym. 2003).

1.2.2 Lämpötilan kohoamisen vaikutus VOC-emissioihin

Suomen metsät palauttavat jopa 10 % sitomastaan hiilestä takaisin ilmakehään VOC-yhdisteinä. Tämä on huomattava määrä, sillä vuonna 2008 metsien arveltiin sitovan 41,9 miljoonaa tonnia hiilidioksidiekvivalenttia (Metla).

VOC-yhdisteiden tuotanto on voimakkaasti sidoksissa vallitseviin valaistus- ja lämpötilaolosuhteisiin. Niiden määrissä onkin havaittavissa selkeää vuodenaikaisvaihtelua. Suomessa metsät tuottavat suurimmat piikit VOC-yhdisteiden määriin aikaisin keväällä

kasvukauden alkaessa sekä myöhäiskesällä, jonka jälkeen pitoisuudet alkavat asteittain laskea talvea kohti (Tarvainen ym. 2005). Vuorokausitasolla VOC-yhdisteiden tuotanto keskittyy päivän valoisaan aikaan, tehostuen sen mukaan mitä enemmän lämpötila kohoaa ja auringon fotosynteesistä aktiivisen säteilyn (PAR) intensiteetti kasvaa. Valon intensiteetillä on kuitenkin lämpötilaa huomattavasti pienempi merkitys VOC-yhdisteiden tuotannossa (Tarvainen ym. 2005, Räisänen ym. 2008).

Kohonnut lämpötila tehostaa VOC-yhdisteiden tuotantoa ja vapautumista ilmakehään (Guenther ym. 1993). VOC-yhdisteiden tuotantoa ohjaavien entsyymien aktiivisuus kaksinkertaistuu lämpötilan kohotessa 10 °C (Constable ym. 1999). Entsyymitoiminnan aktiivisuuden huippu saavutetaan +40 °C:ssa, jonka jälkeen tuotanto alkaa taas vähentyä (Filella ym. 2007). Suurin osa havupuista indusoituvista VOC-yhdisteistä on monoterpeenejä ja isopreenia, seskviterpeenejä muodostuu huomattavasti pienempiä määriä (Sallas ym. 2003, Luomala ym. 2005, Laurila ym. 1999, Tarvainen ym. 2005, Räisänen ym. 2008). Osan VOC-yhdisteistä arvellaan toimivan suoraan jonkinlaisina suojaavina yhdisteinä kuumuutta ja kasvin kokemaa lämpöstressiä vastaan. Esimerkiksi α -pineenillä saattaa olevan tällainen suojaava rooli kohonnutta lämpötilaa vastaan (Hartikainen ym. 2009). Kohonnut lämpötila ei kuitenkaan aina toimi emissioita lisäävänä tekijänä, vaan esimerkiksi männyllä lämpötilan kohoamisen on kuitenkin aikaisemmin raportoitu jopa alentavan VOC-yhdisteiden tuotantoa (Räisänen ja muut 2008).

Lämpötilan lisäksi VOC-yhdisteiden kokonaistuotantoon ja yksittäisten yhdisteiden määriin ja keskinäisiin suhteisiin vaikuttavat monet muut tekijät. Yleensäkin kaikki kasvin kokema stressi lisää VOC-tuotantoa, oli stressin aiheuttaja sitten ilmansaasteet, herbivoria, säteily, kuivuus tai kuumuus. Yksilötasolla tarkastellen geeniperimä aiheuttaa puiden välillä suuria eroja VOC-tuotannossa (Hartikainen ym. 2009).

1.3 OTSONI

1.3.1 Alailmakehän otsoni

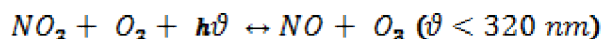
Otsonia (O_3) on sekä yli 12 kilometrin korkeudessa stratosfäärissä, että 0 - 12 kilometrin korkeudella troposfäärisenä eli alailmakehän otsonina. Stratosfäärissä otsoni muodostaa maapalloa suojaavan otsonikerroksen, joka suodattaa osan haitallisesta auringon UV-säteilystä ja toisaalta stabiloi maapallon pinnan lämpötilaa estämällä heijastuvan lämpösäteilyn karkaamista avaruuteen. Alailmakehän otsoni puolestaan on suurimmalle osalle eliöstöstä haitallinen, voimakkaan reaktiivinen kasvihuonekaasu. Maapallon kaasukehän kokonaisotsonipitoisuudesta stratosfääriotsonin osuus on 90 – 95 %, loppu 5 – 10 % otsonista on 0 - 12 kilometrin korkeudessa troposfäärisenä otsonina.

Troposfääriotsonin pitoisuudet vaihtelevat alueellisesti ja vuodenajasta riippuen (Engardt ym. 2009). Otsonin määrä vaihtelee pohjoisella pallonpuoliskolla 20 - 45 ppb:n välillä, akuuttien piikkien noustessa pitkälti yli 100 ppb:n (EEA 2009). Yksittäisen otsonimolekyylin elinikä ilmakehässä on olosuhteista riippuen muutamasta tunnista päiviin (Engardt ym. 2009). Euroopassa alailmakehän otsonipitoisuudet ovat korkeimmillaan kesäaikaan ja ne ovat keskimäärin korkeampia Etelä-Euroopassa kuin pohjoisemmilla alueilla (Andersson & Engardt, 2010). Mitä ylemmäs merenpinnan tasolta nousee, sitä korkeammiksi kohoavat samalla otsonipitoisuudet, joten vuoristoisten ja alavampien alueiden metsissä altistuminen on erilaista (Wieser ym. 2009).

Sama pohjois-eteläsuuntainen trendi alailmakehän otsonipitoisuuksissa näkyy tulevaisuutta mallintavissa ilmanlaatuskenaarioissa. Otsonipitoisuuden yleisen kehityssuunnan mallintaminen onnistuu melko luotettavasti seuraavaan 100 vuoden jaksolle, mutta luotettavaa arviota tulevien vuosikymmenten tai -satojen todellisista pitoisuuksista niillä ei pystytä määrittämään. Jo kerätyn datan avulla tehtyjen mallintarkistusten perusteella laskennallisesti saadut O_3 -pitoisuudet ovat olleet huomattavasti alhaisempia todellisuudessa mitattuihin pitoisuuksiin verrattuna (Denby ym. 2010).

Alailmakehän otsoni luokitellaan kasvihuonekaasuksi. Otsonin muodostumisen prekursoreina toimivat hiilivedyt ja typen oksidit sekä erinäiset biogeenista alkuperää olevat haihtuvat orgaaniset yhdisteet, mm. kasvillisuuden tuottamat VOC-yhdisteet, jotka muuttuvat fotokemiallisissa reaktioissa (kaava 1) lopulta otsoniksi (Engardt ym. 2009). Näitä prekursoreita muodostuu sekä luontaisista lähteistä, kuten salamoinnissa, maaperän toiminnoissa ja valtamerissä, että ihmistoiminnan tuloksena energiateollisuudesta ja liikenteen päästöistä (Anttonen 1996). Tulevaisuuden O₃ -pitoisuuden kohoaminen alailmakehässä johtuukin suurelta osin prekursoreina toimivien antropogeenisistä lähteistä peräisin olevien kasvihuonekaasujen emissiomäärien jatkuvasta kasvusta (Andersson & Engardt 2010).

kaava 1. typpidioksidin reaktio otsoninmuodostuksessa



Valon intensiteetin kasvaessa ja vastaavasti aallonpituuden lyhentyessä otsonin muodostus tehostuu, joten troposfääriotsonin pitoisuudet ovat korkeimmillaan kesällä iltapäivisin. Määrällistä vaihtelua esiintyy vuosi- ja päivätasolla sekä eri vuorokaudenaikojen välillä (Engardt 2010). Suomessa talvikuukausien (loka-maaliskuu) aikana auringon säteilyn vähäisyys estää otsonin muodostumista, jolloin talvikuukausien otsonipitoisuudet jäävät täällä hyvin alhaisiksi (Anttonen 1996).

1.3.2 Alailmakehän otsonin vaikutukset kasvianatomiaan ja VOC-emissioihin

Alailmakehän otsoni on puille ja suurimmalle osalle muista elävistä organismeista voimakkaasti haitallinen kasvihuonekaasu. Haitallisuus perustuu otsonin reaktiivisuuteen; lehteen tai neulaseen päästyään epästabiili otsonimolekyyli reagoi apoplastisten nesteiden kanssa muodostaen reaktiivisia happiradikaaleja (lyh. ROS, sanoista *reactive oxygen species*) kuten vetyperoksidia, superoksidgeja sekä hydroksyyli-radikaaleja (Long & Naidu 2002). Nämä aiheuttavat epätasapainoa solun hapetus-pelkistystilassa eli aikaansaavat niin kutsutun oksidatiivisen stressitilan. Solu kykenee suojautumaan jossain määrin oksidatiivista stressiä vastaan tuottamalla antioksidatiivisia yhdisteitä, jotka muokkaavat ROS -yhdisteitä haitattomampaan muotoon ja korjaavat niiden aiheuttamia vaurioita. Mikäli ROS-yhdisteitä muodostuu nopeammin kuin niitä ehditään hajottaa, vaurioittavat ne proteiineja tai hapettavat pahimmillaan DNA:ta aiheuttaen mutaatioita (Langebartels ym. 2002). Otsoniherkkyyttä määrittää lajin tai puuyksilön kyky reagoida otsonin aiheuttamaan stressiin (Hartikainen ym. 2009). Nykytietämyksen mukaan lehtipuut ovat havupuita herkempiä otsonille (Wittig ym. 2009), mutta asia ei ole yksiselitteinen. Osasyynä on todennäköisesti havupuiden matalampi ilmarakokonduktanssi, jolloin otsonin sisäänotto jää vähäisemmäksi kuin lehtipuilla (Sandermann Jr. 1996).

Otsonille altistuminen aiheuttaa VOC-emissioiden lisääntymistä (Hartikainen ym. 2009, Calfapietra ym. 2009) ja solutasolla selkeitä, otsonin aiheuttamiksi tunnistettavia vaurioita. Voimakkaimmin otsonistressille altistuneilla alueilla puustossa on yksilö- ja populaatiotasolla silmin havaittavissa lehtien tai neulasten karistamista (havupuilla harsuuntuminen), pigmenttihäiriöitä sekä kloroosin aiheuttamaa lehtien/neulasten kellastumista. Jo ennen näiden näkyvien muutosten muodostumista otsoni vaikuttaa kasvin biokemiaan, aiheuttaen muutoksia tiettyjen entsyymien toiminnassa ja tuotannossa sekä lisäten useiden antioksidantteina toimivien yhdisteiden, kuten putreskiinin ja katekiinin määrää (Sandermann Jr. 1996).

Otsonin sisäänotto tapahtuu ilmarakojen kautta ja se tehostuu ilmankosteuden, tuulen nopeuden ja valon intensiteetin kasvaessa, lämpötilan kohotessa sekä ilman ja neulasen vedenpaine-eron ollessa pieni (Kivimäenpää 2003, Klingenberg ym. 2010). Vaurioiden muodostumisen rajana pidetään 40

ppb:ia (EEA), jonka pohjalta on määritelty nk. AOT40 -arvo (sanoista **accumulated over threshold**). AOT40 on vuotuinen otsonialtistusta kuvaava arvo, joka lasketaan summaamalla päiväkohtaisesti 40 ppb(v) ylittäneen otsonin tuntikeskiarvot yhteen valoisana aikana huhti-syyskuun ajalta. Nykyinen kriittinen AOT40 -arvo metsäpuille on 5000 ppb.h. AOT40 -arvoa on tunnuslukuna kuitenkin kritisoitu siitä, että ilmakehän otsonipitoisuus ei korreloi suoraan puun sisäänottaman otsonimäärän kanssa (Klingenberg ym. 2010).

Otsonille altistuminen voi olla joko akuuttia tai kroonista (Anttonen 1996). Akuutissa altistuksessa hetkellinen hyvin korkea otsonipitoisuus aiheuttaa nopeasti ilmeneviä vaurioita, kroonisessa altistuksessa vauriot kumuloituvat neulaseen/lehteen pidemmällä aikavälillä. Kroonisen ja akuutin altistuksen aiheuttamat vauriot poikkeavat hieman toisistaan ja ne ilmenevät jopa lehden/neulasen eri osissa (Kivimäenpää 2003). Havupuilla vaurioita muodostuu ensiksi yläpuolen ilmarakojen välittömässä läheisyydessä olevaan mesofyllisolukkoon, josta ne ”leviävät” myöhemmin neulasen sisempiin solukerroksiin otsonialtistuksen jatkuessa (Sutinen ym. 1990). Vauriot ovat paremmin havaittavissa vanhemmissa neulasvuosikerroissa, joissa otsonivaikutus on kumuloitunut.

Ensimmäiset otsonivauriot ilmenevät kloroplasteissa, joiden koko pienenee. Soluun ilmestyy ribosomin kaltaisia jyväsiä ja tärkkelysjyvästen koko vastaavasti pienenee. Seuraavaksi tapahtuu muutoksia entsyymiaktiivisuudesta vastaavissa mikrobodeissa ja vakavan vaurion muodostuttua mitokondrioissa, tässä vaiheessa myös solulima alkaa hajota (Sutinen ym. 1990, Palomäki ym. 1996, Anttonen 1996). Otsonialtistuksessa rasvojen määrä soluissa ja niiden rakenteet muuttuvat (Anttonen 1996).

Akuutissa altistuksessa lopulta tapahtuu tylakoidien hajoaminen ja mesofyllisolukon luhistuminen, mikä johtaa apoptoosin kautta neulasen kellastumiseen ja neulasten ennenaikaiseen karisemiseen (Anttonen 1996). Kaikkiaan otsoni aiheuttaa soluissa ennenaikaista ikääntymistä sekä erilaisten normaalien toimintojen, kuten talveutumisprosessin, häiriintymistä (Sutinen ym. 1990, Kivimäenpää 2003).

2. KOKEELLINEN OSUUS

2.1 TYÖN TAVOITTEET

Otsonipitoisuuden kohottamisen arvellaan lisäävän VOC-yhdisteiden emissionopeuksia (Rinnan ym. 2005). Kohonneen lämpötilan on havaittu toisella havupuulla, männyllä, jopa vähentävän VOC-emissionopeuksia (Räisänen ym. 2008) ja nyt kokeessa haluttiin selvittää, miten kuusi reagoi kohotettuun lämpötilaan.

Neulasanatomian tarkastelulla haluttiin tutkia, vaikuttaako käsittelyt neulasen rakenteeseen ja jos vaikuttaa, niin voisiko nämä muutokset mahdollisesti selittää VOC-emissioita. Tutkimuksessa hypoteeseiksi valittiin seuraavat neljä kohtaa:

- i) onko kohotetulla otsonipitoisuudella tai kohotetulla lämpötilalla vaikutusta kuusen VOC-emissioihin?
- ii) onko kohotetulla otsonipitoisuudella tai kohotetulla lämpötilalla vaikutusta kuusen neulasanatomiaan?
- iii) onko lämpötila- tai otsonikäsittelyiden välillä havaittavissa interaktioita, ja mitä vaikutuksia käsittelyillä on VOC-emissioihin tai neulasanatomiaan?
- iv) voidaanko mahdollisia eroja VOC-emissioissa selittää neulasen rakenteellisilla muutoksilla?

Tutkimuksen aihetta voi pitää hyvinkin ajankohtaisena, sekä Suomen parin edellisen kesän poikkeuksellisen lämpimyden että yleisen lämpötilatrendin jo pidempään jatkuneen nousun vuoksi. Lisäksi biogeenisiä eli luonnollisista lähteistä peräisin olevia VOC – päästöjä on tutkittu huomattavasti enemmän lehtipuilla. Lehti- ja havupuilla vaikutukset eivät kuitenkaan ole suoraan verrattavissa toisiinsa. Suomalaisilla lehtipuilla lehtien ikä on aina rajoittunut yhteen kasvukauteen,

jolloin lähinnä voimakkaiden altistusten akuutit tai herkillä lajeilla ensimmäiset kroonisen altistuksen aiheuttamat vaurioitumisen oireet ehtivät ilmetä, kun taas havupuiden useampivuotisen neulaskierron vuoksi niissä tapahtuu suuremmassa määrin vaurioiden kumuloitumista. Eri lajien välillä on voimakasta vaihtelua otsonistressin siedossa ja herkimmille lajeille voi muodostua vaurioita jo alle vaurionmuodostuksen rajana pidetyssä AOT40:ssä.

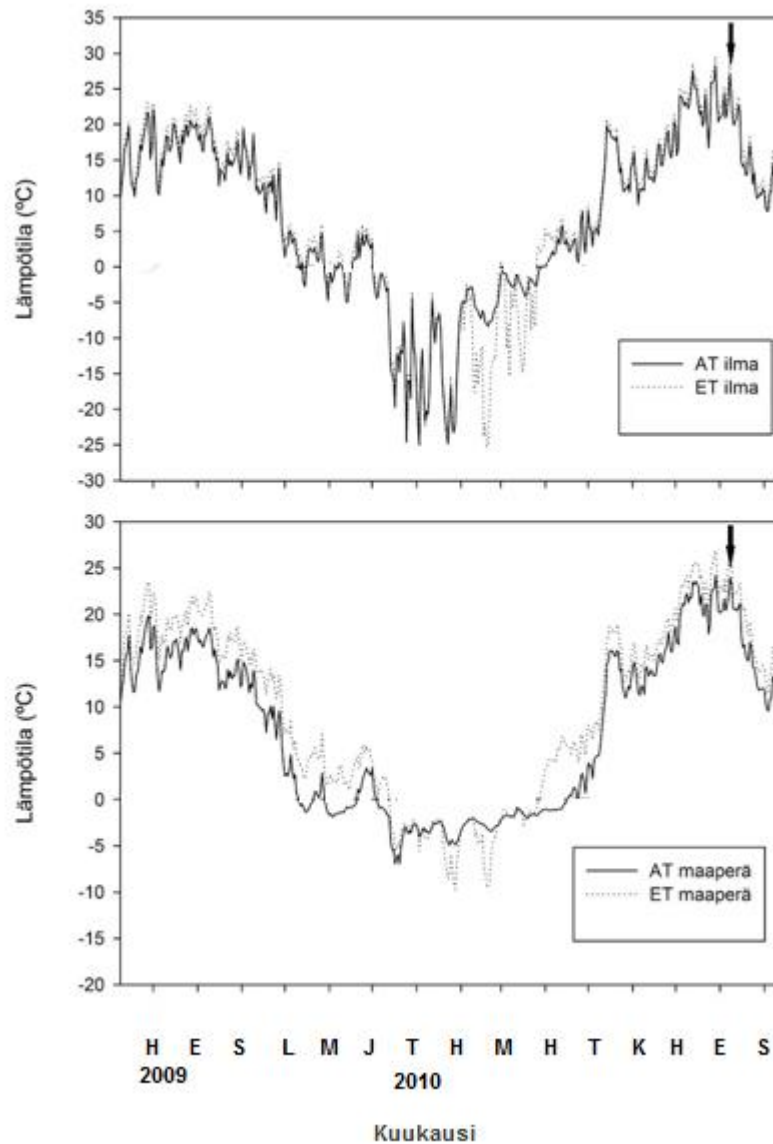
3. AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1. KOEJÄRJESTELY

Kokeessa käytetyt kolmevuotiaat, siemenalkuperää olevat kuusentaimet hankittiin Metsäntutkimuslaitokselta Suonenjoelta (siemenalkuperä Virrat 61°32'N-63°02'N, 21°05'E-24°59'E). Ne oli siirretty Ruohoniemen koekentälle (62°37'N, 26°11'E) 1.6.2009 ja istutettu satunnaistetusti 16 eri 180 x 140 cm kokoiselle kasvatusruudulle, jossa kasvualustana oli 2:1 Kekkilän puutarhamulta ja puhdistettu luonnonhiekkä (raekoko 0-5 mm). Kullakin kasvatusruudulla oli kokeen alussa 24 koetaimea ja 22 reunataimea. Kasvualustaan lisättiin Peatcare Slow Release 1 –lannoitetta (N:P:K 9:3,5:5, Yara) 4 kg/m³. Kuivastressin välttämiseksi maaperän kosteus pidettiin kasvukauden aikana jatkuvasti yli 10 % kastelemalla koealoja tarpeen mukaan. Maaperän kosteus tarkastettiin päivittäin (Theta Probe ML2, Delta-T Devices, Cambridge, England) neljästä kohtaa jokaiselta kasvatusruudulta, n. 4 cm:n syvyydestä.

Altistuskenttinä toimivia 10 m läpimittaisia kehiä oli käytössä yhteensä kahdeksan, joista neljässä oli kohotettu otsonikäsittely ja neljä toimi vallitsevan O₃-pitoisuuden kontrolloikehinä. Lisäksi jokaisessa kehässä oli neljä erillistä kasvatusruutua, joista kahdessa oli kohotettu lämpötiläkäsittely, kaksi toimi kontroleina. Toinen kontrollikasvatusalustoista ja kohotetun lämpötilan kasvatusruuduista oli käytössä tässä kokeessa. Infrapunälämmittimet (Model Comfortintra CIR 105-220, 230-400 V, Frico AB Sweden) oli sijoitettu kasvatusruudun keskelle kuusentaimien yläpuolelle kehikkoon noin 70 cm:n korkeudelle taimien latvuksista. Mahdollisen lämmittimien

aiheuttaman varjostusvaikutuksen eliminoimiseksi myös lämmittämättömille ruuduille oli laitettu samankokoiset ja -väriset varjostavat puupalkit. Kuusentaimet oli siis jaettu neljään eri käsittelyyn; AT + AO (kontrolli; normaali lämpötila, normaali otsonipitoisuus), ET + AO (kohotettu lämpötila, normaali otsonipitoisuus), AT + EO (normaali lämpötila, kohotettu otsonipitoisuus) ja ET + EO (kohotettu lämpötila, kohotettu otsonipitoisuus). Jokaisesta kokeesta olevasta käsittelystä oli neljä rinnakkaista toistoa, kussakin mukana noin 20 - 30 taimea. Kohotetussa lämpötilassa puut altistettiin vallitsevalle lämpötilalle lisättynä reilulla $+1\text{ }^{\circ}\text{C}$:lla, jossa toteutunut keskimääräinen kohotus vuonna 2009 oli $+1,3^{\circ}\text{C}$ ja vuonna 2010 $+1,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ilmasta mitattuna. Lämpötilatietoja kerättiin sekä ilmasta että maaperästä, jossa lämmityksen vaikutus havaittiin jopa suurempana kuin ilmassa. IR-lämmittimet kohottavat enemmän kasvien lehtien kuin ilman lämpötilaa (De Boeck & Nijs 2011), mutta neulasten lämpötiloja ei tässä tutkimuksessa mitattu, koska lehvästön tarkat lämpötilamittaukset kenttäoloissa ovat hankalia. VOC-emissioita laskettaessa on käytetty ilmasta mitattuja lämpötilatietoja. Vuosien 2009 ja 2010 lämpötilatiedot on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Lämpötila Ruohoniemi 2009-2010. Altistuskautena 2009-2010 Ruohoniemen koekentältä ilmasta ja maaperästä mitattu lämpötiladata, AT = lämpötila kontrollikentillä; ET = lämpötila kentillä, joissa lisälämmittimet. Nuoli osoittaa tutkielmassa esitetyn VOC-keräyksen ajankohdan.

Kohotetussa otsonissa tavoitteena oli kaksinkertainen otsonipitoisuus vallitsevaan nähden, toteutuneen kohotuksen jäädessä kuitenkin vain noin 1,4-kertaiseksi. Otsonialtistus käynnistettiin keväällä kasvukauden alkaessa 5.5.2010 ja se oli päällä joka päivä valoisien tuntien ajan (klo 8.00 – 22.00). Pumput menivät automaattisesti pois päältä sateella, tuulen ollessa hyvin alhainen tai

voimakas sekä vallitsevan otsonipitoisuuden jäädessä alle 10 ppb:iin. Lämpötila-altistus oli jatkuvasti päällä.

Vuonna 2009 taimien saama otsonialtistuksen AOT40-arvo oli lisätyn otsonin kentillä keskimäärin 4708 ppb.h ja kontrollikentillä 136 ppb.h. Vastaavasti vuonna 2010 AOT40 oli otsonikentillä 13481 ppb.h ja kontrollikentillä 1386 ppb.h. Kertymätietoja tarkasteltaessa on kuitenkin hyvä huomata, että vuoden 2009 data on kerätty 8.6. - 30.9. ja vuoden 2010 5.5. - 17.9. Huomioitaessa molempina vuosina ainoastaan väli 8.6. - 17.9. oli ylitys kontrollikentillä 135 ppb.h (2009) ja 605 ppb.h (2010). Vastaavasti kohotetun otsonin kentillä ylitys vuonna 2009 oli 4320 ppb.h ja vuonna 2010 se oli 8229 ppb.h. Kuukausittaiset päiväkeskiarvot olivat kesäkuussa kontrollikentältä 29 ppb ja otsonialtistuksessa 42 ppb, heinäkuussa 30 ppb (kontrolli) ja 44 ppb (kohotettu O₃) sekä elokuussa 26 ppb (kontrolli) ja 38 ppb (kohotettu O₃). Otsonipitoisuuden kesänaikainen maksimi kontrollikentältä mitattuna oli 43 ppb (29.7.2010) ja kohotetun otsonin kentältä 67 ppb (6.7.2010).

VOC –keräykseen valittiin satunnaisesti taimia, joissa ei ollut kentän reunavaikutusta ja joissa ei lähtökohtaisesti näkynyt ulkoisia vaurioita, kuten neulasten puuttumista tai kellertymistä. Satunnaistamisessa apuvälineenä käytettiin <http://www.random.org> –sivuston satunnaislukugenerointia. Lämpötilakäsittelyssä olleista taimista suurempi osuus oli kuollut edellisenä, alueelle poikkeuksellisen kylmänä talvena.

3.2 MENETELMÄT

3.2.1 VOC-yhdisteiden keräys

VOC-keräys suoritettiin 2.-3.8.2010, jolloin 2.8. suoritetussa keräyksessä kolmannen keräimen imuletku oli irtonnut, minkä vuoksi osa näytteistä jouduttiin keräämään uudelleen seuraavana päivänä.

Keräys pussit (Freetime kinkkupussi, koko L 45 x 55 cm, materiaali polyetyleenitereftalaatti) puhdistettiin uunissa +120 °C:ssa 1 tunnin ajan. Keräyshetkeen asti puhdistettuja pusseja säilytettiin samalla tavoin puhdistetussa, tiiviisti suljetussa PET-pussissa. Kaikki pussien käsittely kuumentamisen jälkeen tehtiin puuvillakäsineitä käyttäen. Käytössä olleiden keräinten pumpput kalibroitiin ennen aloittamista käyttämällä apuna Mini-Buck –saippuakuplakalibraattoria (AP Buck Inc, Orlando Florida, USA).

Kuumina ja kirkkaina päivinä kerättävien kenttien päälle asetettiin valkoinen harsokangas estämään taimien liiallista kuumenemistä suojaamalla niitä suoralta auringonvalolta. Kerättäviin taimiin kiinnitettiin pienet lämpötila-anturit (Hygrochron DS1923-F5 iButton, Maxim Integrated Products, Inc., CA.), jotka keräsivät tietoa pussin sisälämpötilasta ja ilmankosteudesta. Lisäksi keräyskentälle sijoitettiin HOBO[®] micro station –anturit (Onset Computer Corporation), jotka keräsivät kentän yleisiä lämpötilatietoja pussin ulkopuolelta sekä mittasivat auringonvalon PAR-tasoa (photosynthetically active radiation, fotosynteesin tapahtumisen kannalta aktiivinen säteily).

Keräystä varten PET-pussi asetettiin varovasti taimen päälle ja kiristettiin alhaalta neulasettoman varren ympärille sulkijaa käyttäen niin, että pussi oli mahdollisimman ilmatiiviisti paikoillaan. VOC-yhdisteet kerättiin Tenax TA (150 mg) adsorbenttiin käyttäen kenttäolosuhteisiin kehitettyä keräyssysteemiä. Teflonista valmistettu tuloilman letku sijoitettiin pussin alalaidalta sen sisään siten, että letkun pää ei koskettanut keräyspussia. Pussin sisällä olevat olosuhteet vakioitiin ennen varsinaista keräystä pumpaamalla siihen puhdistettua ilmaa 15 minuutin ajan vakiovirtauksella n. 600 ml/min. Ilman puhdistusta varten keräyssysteemin pumppuun oli liitetty epäpuhtauksien ja otsonin poistoa varten otsoniscrubberi (Ozone Scrubber Cartridge, Environnement S.A. France) sekä aktiivihiilifiltteri (Wilkerson F03-C2-100, Mexico). Tämän jälkeen viileässä (+4 °C) säilytetty, puhdas adsorbenttia sisältävä teräsputki asetettiin pussiin sen yläkulmasta leikatun reiän kautta tuetusti siten, että se ei koskettanut pussin laitaa ja kiristettiin pussinsulkijalla. Varsinaisessa 15 minuutin mittaisessa keräyksessä pumpun ilmavirta oli säädetty mahdollisimman lähelle 300 ml/min ja Tenaxin läpi kulkevan imun 200 ml/min. Keräyksen lopuksi Tenax-putki poistettiin pussista, suljettiin messinkikorkeilla ja siirrettiin kylmään (+4 °C) odottamaan GC-MS -

analysointia. Käytössä olleiden keräinten pumpput kalibroitiin ennen aloittamista käyttämällä apuna Mini-Buck –saippuakuplakalibraattoria (AP Buck Inc, Orlando Florida, USA).

VOC-päästöjen laskemista varten keräyspussissa ollut osa taimea otettiin talteen 4.8.2010 ja siitä eroteltiin vanha ja uusi kasvu, sekä jälkikasvu omiksi erillisiksi näytteikseen. Näytteitä kuivattiin paperipusseihin suljettuna +60 °C:ssa uunissa 3 vuorokautta, jonka jälkeen ne punnittiin Precisa XT 1220M –vaa’alla (tarkkuus 0,001 g).

3.2.2 GC-MS – analyysi

Tarvittavia GLV-, terpeen- ja isopreenistandardeja varten puhdistettuihin Tenax TA –putkiin injektointiin mikroruiskua käyttäen 2 µl valmista standardiliuoksia, joissa oli tunnettu määrä tutkittavia yhdisteitä (liitteet 1 ja 2). Kaikista standardiliuoksista valmistettiin kaksi putkea, jotka analysoitiin kaasukromatografimassaspektrometrillä (GC-MS) näytteiden kanssa.

Näytteet ajettiin kaasukromatografimassaspektrometrillä (Hewlett Packard GC type 6890, MSD 5973). Ajoa varten näyteputkiin vaihdettiin teflonkorkit ja putket asetettiin massakromatografian karuselliin. Adsorbentista VOC-yhdisteet analysoitiin (Perkin Elmer ATD400 Automatic Thermal Desorption System) kuumentamalla näytteet +250 °C 10 minuutiksi, sen jälkeen jäähdyttämällä -30 °C:een kylmäloukussa, josta ne injektointiin välittömästi HP-5 -kapillaarikolonnein (J & W Scientific, Folsom, CA. pit. 50 m x \varnothing 0,2 mm x 0,33 µm filmin paksuus). Lämpötila oli ensimmäisen minuutin ajan +40 °C, jonka jälkeen sitä nostettiin ensin +5 °C/min⁻¹ +210 °C:een, sitten +20 °C/min⁻¹ 250 °C:een. Eluenttikaasuna oli helium. Näytteistä analysoitiin isopreeni, mono- ja seskviterpeenit sekä GLV-yhdisteet vertailemalla massaspektrejä puhtaisiin terpeenistandardeihin Wileyn 275L kirjaston avulla (Agilentin MSChemStation versio D.01.02.16 Agilent Technologies 1989 - 2004).

Saaduista tuloksista vähennettiin kenttänoollista saadut emissiot, jotka olivat todennäköisesti lähtöisin joko keräyspusseista tai –laitteistoista eivätkä näytetaimista itsestään. Mikäli kenttänoollien päästöt olivat jonkin näytteen osalta suuremmat kuin näytteestä mitatut, merkattiin päästömääräksi näytteessä kyseisen yhdisteen osalta nolla, sillä negatiivinen tulos ei ollut hyväksyttävä. Kenttänoollien päästöt olivat nonanaalin osalta suuremmat kuin näytteestä mitatut, mikä viittasi siihen, että nonanaalia pääsee ympäröivästä ilmasta suodattimien läpi keräyspussiin. Näin ollen nonanaalia ei huomioitu tuloksissa.

Lopulliset terpeniemissiotulokset standardoitiin yhdistekohtaisesti käyttämällä kaavaa 2 (Hakola ym. 2006, Guenther ym. 1993):

Kaava 2.

$$E = \frac{F (C2 - C1)}{m} \cdot 60$$

jossa

F = korvausilman virtausnopeus l/min

C2 = Tenaxiin kerätty terpeenipitoisuus, ng/l

C1 = terpeenipitoisuus pussiin menevässä ilmassa (0, sillä keräyksessä käytettiin suodatettua ilmaa).

Lisäksi nollanäytteistä kerätyt päästömäärät vähennettiin varsinaisista näytteistä saaduista päästöistä. Tällä eliminoitiin muualta kun kasvista peräisin olleiden VOC-yhdisteiden tuloksia sekoittava vaikutus.

m = kerätyn taimen/neulasten kuivapaino

Saadut tulokset ovat muotoa $\text{ng/h}^{-1}/\text{g(kp)}^{-1}$ eli VOC-yhdisteen määrä nanogrammoina tunnissa kuivapainoa kohden. Lämpötilasta voimakkaasti riippuvaisille terpeenituloksille tehtiin kaavaan vielä korjaus (kaava 3), jolla ne ekstrapoloitiin vastaamaan tilannetta +30 °C:n lämpötilassa (Guenther ym. 1993).

Kaava 3.

$$M_s = \frac{M}{\exp(\beta(T-T_s))}$$

jossa

M_s = terpeenipitoisuus standardilämpötilassa (+30 °C)

M = terpeenipitoisuus keräyslämpötilassa

β = kokeellinen vakio, monoterpeeneille 0,09 ja seskviterpeeneille 0,16

T = keräyslämpötila, K

T_s = standardointilämpötila (+30 °C), K

Isopreenit standardoitiin kaavan 4. mukaisesti vastaamaan emissiomäärää +30 °C:n lämpötilassa ja PAR-arvolla 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}$ (Guenther ym. 1993).

kaava 4.

$$I_s = \frac{I}{\frac{\alpha c_{1L} L}{\sqrt{1 + \alpha^2 L^2}} * \frac{\frac{\exp(C_{T1}(T - T_s))}{RT_s T}}{1 + \frac{\exp(C_{T2}(T - T_M))}{RT_s T}}}$$

jossa

I_s = isopreenin standardoitu emissiomäärä (+30 °C, PAR 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}$)

I = keräyksessä saatu isopreenin emissio

α = vakio 0,0027

C_{IL} = 1,066

L = keräyksenaikainen PAR, $\mu\text{mol m}^{-2}$

C_T = isopreenin määrä +30 °C:ssa ja PAR-arvolla 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}$

R = vakio 8,314 J K⁻¹ mol⁻¹

C_{T1} = 95 000 J mol⁻¹

C_{T2} = 230 000 J mol⁻¹

T_M = vakio, 314 K

T = keräyslämpötila, K

T_s = standardointilämpötila (+30 °C), K

GLV-yhdisteille ei ole kirjallisuudessa vastaavia standardointikaavoja.

3.2.3 Valomikroskopia

Mikroskooppitarkastelua varten jokaisesta näytetaimesta kerättiin 3.8.2010 kello 13.00 - 14.00 neulasnäytteet. Taimet olivat samoja, joista kerättiin VOC-näytteet. Keräyshetkellä sää Ruuhoniemen koekentällä oli aurinkoinen, lämpötila +31,1 °C. Yhdestä taimesta valittiin 4-5 kappaletta neulasia niin, että ne kerättiin pinseteillä latvuksesta laskien 2. oksakiehkuroista, kuluvan vuoden kasvun sivuversojen yläpuolelta. Jokainen neulanen pyrittiin keräämään eri oksasta, jotta saatiin mahdollisimman kattava käsitys neulasten yleistilasta kyseisessä puuyksilössä. Kerätyt neulaset laitettiin fiksatiivissa (2,5 % glutaraldehydi, 0,05 M fosfaattipuskuri pH 7,2) Eppendorf-putkiin, jotka säilytettiin jääkaapissa (+4 °C) yön yli odottamaan jatkokäsittelyä.

Näytteiden valmistelua jatkettiin seuraavana päivänä leikkaamalla fiksatiivissa olleiden neulasten puolivälistä noin 1-2 millin mittaisia näytepaloja. Yhdestä taimesta tuli näin ollen 4-5 näytekappaletta, yksi jokaisesta kerätystä neulasesta. Samasta taimesta otetut näytteet laitettiin samaan eppendorf -putkeen esikäsittelyä varten.

Käsittely aloitettiin pesemällä näytepalat fosfaattipuskurilla 3 x 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen suoritettiin jälkifiksaatio fosfaattipuskuriin tehdyllä 1 % osmiumtetroksidilla (CAS 20816-12-0), jonka annettiin vaikuttaa jääkaappilämpötilassa (+4 °C) viiden tunnin ajan. Osmiumtetroksidi huuhdeltiin fosfaattipuskurilla 3 x 10 minuutin vaikutusajalla, jonka jälkeen näytteet jätettiin kolmanteen puskurinesteeseen yön ylitse +4 °C:een.

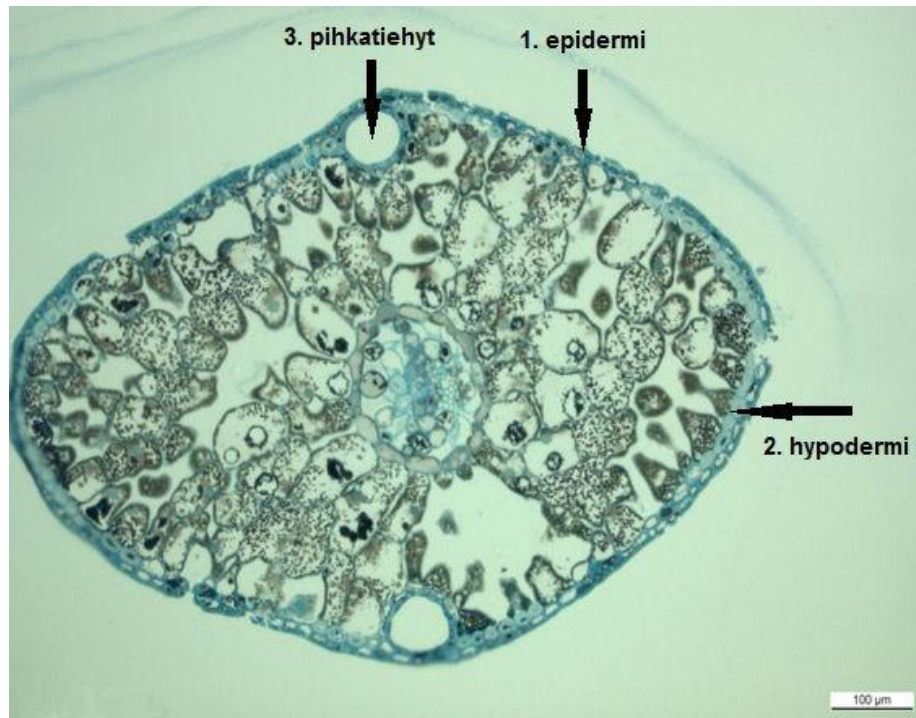
Dehydrointi aloitettiin kolmantena päivänä. Ensin näytteistä poistettiin fosfaattipuskuri, jonka jälkeen aloitettiin dehydrointi (veden poistaminen) nousevalla etanolisarjalla. Dehydrointi suoritettiin huuhtomalla näytteitä 3 x 10 minuuttia ensin 50 % etanolissa, sitten toistamalla 3 x 10 minuuttia 70 % etanolissa, 3 x 10 minuuttia 94 % ja lopuksi 3 x 10 minuuttia 99,5 % etanolissa säilyttäen näytteitä vaihtojen väliajat +4 °C:ssa. Dehydroinnin jälkeen näytteet huuhdottiin 3 x 10 minuutin ajan propyleenioksidilla. Propyleenioksidikäsittelyjen välillä näytteet säilytettiin huoneenlämmössä. Lopuksi näytteisiin lisättiin 1:1-jaotuksella valmistettu propyleenioksidi – eponiseos (eponi laboratoriolaatu Ladd LX112, viskositeetti 185 cP +25 °C), jossa neulaskappaleet jätettiin eppendorf-putkissa korkit auki vetokaapin näytesekoittimeen (Agar Scientific) 24 tunniksi.

24 tunnin haihdutuksen jälkeen jokaisesta eppendorfista siirrettiin kaksi näytettä (kahden eri neulasen näytteet) vaakapetausblokkeihin. Tässä vaiheessa hylättiin ne neulaskappaleet, jotka eivät olleet laskeutuneet putkien pohjalle kuluneen 24 tunnin aikana. Näytekappaleet aseteltiin blokkiin pituussuunnan mukaisesti. Näyteblokit täytettiin eponihartsilla ja jätettiin huoneenlämpöön yön yli jotta mahdollisesti näytteisiin jäänyt propyleenioksidi pääsee haihtumaan pois. Lopuksi blokit siirrettiin 60 asteeseen 3 vuorokaudeksi kovettumaan (Hartikainen ja muut 2009). Tämän jälkeen näytteistä leikattiin 1,5 µm:n paksuisia leikkeitä mikrotomilla (Reichert Jung Ultracut E), jotka värjättiin pitämällä 30 minuutin ajan 1% toluidiiniliuoksessa (1 ml toluidiinisininen, 20 ml 2,5%

natriumbikarbonaatti). Ylimääräinen väriaine huuhdeltiin ionivaihdetulla vedellä ja leikkeet kiinnitettiin objektilevyille, jossa ne värjättiin vielä 1% fenyleenidiamiiniliuoksella (Kivimäenpää ym. 2010).

Preparaattien tarkastelussa käytettiin valomikroskooppia (Zeiss Axiolab, Oberkochen Germany) ja näytteet valokuvattiin mikroskooppisovittimen avulla Olympus Camedia C-5060 Wide Zoom-kameralla (5,1 mpix). Jokaisesta preparaatista otettiin yleiskuva (kuva 2, 10x objektiivisuurenno), kuvat neulasen yhteyttävästä solukosta ylä- ja alapinnan puolelta sekä pihkatiehyistä (40x objektiivisuurenno) eli yhteensä viisi kuvaa, mikäli preparaatissa näkyi molemmiin puoliin pihkatiehyet. Hajonnan vähentämiseksi ja tilastollisen luotettavuuden parantamiseksi jokaisesta näytekuusesta oli valmistettu tarkasteltavaksi kaksi erillistä preparaattia.

Kuvista analysoitiin myöhemmin ImageJ-ohjelmalla neulasen ja pihkatiehyiden koot, hypodermin ja epidermin paksuus (kahdeksan mittapisteen keskiarvo/näyte) sekä soluvälitilan prosentuaalinen osuus. Tilastollinen tarkastelu tehtiin käyttämällä SPSS 19-ohjelmistoa.

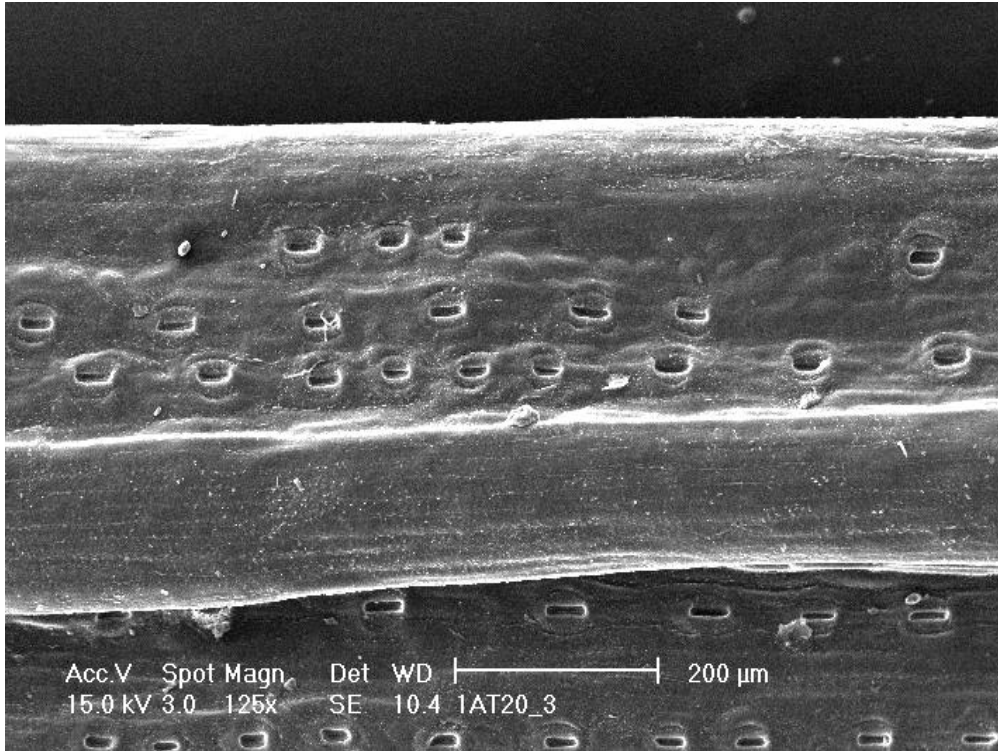


Kuva 2. Valomikroskooppikuva neulasen poikkileikkauksesta, Kuvaan merkitty tarkasteltavat epidermi (1), hypodermi (2) sekä pihkatiehyt (3). Kuva: Minna Kivimäenpää

3.2.4 Pyyhkäisyelektronimikroskopia

Neulasten ilmarakotiheys määritettiin pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Kuivatut (3 vrk +60 °C) neulaset asetettiin alumiinialustalla olevalle kupariteipille. Yhdelle levylle kiinnitettiin samansuuntaisesti viisi neulasta, jotka olivat peräisin samasta kuusesta. Neulaset päällystettiin n. 50 nm paksuiseilla kulta-palladiumkerroksella Polaron E 5100 – päällystyslaitteella (Polaron Equipment Ltd.). Kultauksen tarkoituksena oli sekä parantaa kontrastitarkkuutta mikroskoopilla, että lisätä näytteiden kestävyyttä elektronisuihkun aiheuttamaa kuumenemista vastaan. Näytteiden tarkastelu tapahtui käyttäen XL30 ESEM TMP –pyyhkäisyelektronimikroskooppia. Jokaisesta näytelevylle kiinnitetystä neljästä tai viidestä neulasesta otettiin 3 valokuvaa (kuva 3), jolloin tarkasteltavien kuvien kokonaismääräksi tuli 158. Tarkastelussa jouduttiin hylkäämään epätarkkuuden vuoksi kaksi kuvaa. Kuvista analysoitiin ImageJ-ohjelmaa käyttäen ilmarakojen

määrä /mm² sekä ilmarakorivien lukumäärä. Tilastollisessa analyysissä käytettiin IBM SPSS 19 -ohjelmaa.



Kuva 3. Pyyhkäisyelektronimikroskooppikuva (suurennos 125x) kuusen neulasesta. Kuvassa näkyy ilmarakorivejä.

3.3. TILASTOLLISET ANALYYSIT

Kaikkien tulosten lopullinen tilastollinen tarkastelu tehtiin käyttämällä IBM SPSS 19 Statistics –ohjelmaa. Kerätty data syötettiin ohjelmaan ja aggregoitiin niin, että kultakin näyteplotilta kerätyistä kahdesta rinnakkaisnäytteestä laskettiin keskiarvo. Tällöin saatiin kokeesta tarkasteltavaksi yhteensä 16 tulosta, neljä jokaisesta eri käsittelystä. Ennen VOC-tulosten aggregointia raakadatasta poistettiin tulokset yhden kohotettu O₃ – vallitseva

lämpötiläkäsittelynäytteen osalta, sillä ne poikkesivat muihin verrattuna niin selkeästi, että oli aiheellista olettaa näytteenotossa tai –käsittelyssä tapahtuneen virheen.

Aggregoidusta datasta tarkastettiin tulosten normaalijakautuneisuus käyttämällä pienelle aineistolle soveltuvaa Shapiro-Wilk –testiä. VOC-tulosten kohdalla aineistolle tehtiin tarvittaessa logaritmimuunnos. Lämpötila- ja otsonikäsittelyiden vaikutus sekä näiden mahdolliset interaktiot testattiin käyttämällä Mixed Models ANOVAa, jossa selittävinä tekijöinä olivat otsoni ja lämpötila ja satunnaistekijänä kehä. Satunnaistekijän avulla huomioitiin se, että lämpötiläkäsittelyt olivat aina samassa kehässä ja tulokset näin mahdollisesti riippuvaisia toisistaan. Lopuksi tarkastettiin vielä residuaalit ja mikäli nämä olivat normaalisti jakautuneet ($p < 0,050$), tulos hyväksyttiin. Tarkastelussa tulosta pidettiin tilastollisesti merkitsevä, kun $p < 0,05$ ($\alpha = 5 \%$) ja lähes tilastollisesti merkitsevä, kun $p < 0,10$ ($\alpha = 10 \%$).

4. TULOKSET

4.1. VOC-YHDISTEET

VOC-yhdisteiden emissionopeuksia tarkasteltiin sekä yhdiste- että yhdisteryhmäkohtaisesti. Ryhmittäin tarkasteltujen VOC-yhdisteiden käsittelykohtaiset keskiarvot keskihajontoineen on esitetty taulukossa 2. Ryhmittäin tarkasteltuna lämpötila- tai otsonikäsittelyllä ei ollut havaittavissa tilastollisesti merkitseviä vaikutuksia VOC-emissionopeuksiin eikä ryhmien välillä ollut interaktioita. Ryhmäkohtaisesti tarkasteltaessa yhdisteet oli jaettu kokonaisterpeeneihin, monoterpeeneihin, seskviterpeeneihin, GLV-yhdisteisiin ja metyyllisalisylaattiin sekä isopreeniin. Näytteistä yleisimmin löytyi monoterpeenejä (taulukko 1), joita esiintyi kaikissa näytteissä. Seskviterpeeneihin kuuluvia yhdisteitä löytyi 88 %:sta näytteistä, isopreenia 75%:sta ja GLV-yhdisteitä ja metyyllisalisylaattia 69 %:sta näytteistä.

Kokonaisterpeenien määrässä ei ollut havaittavissa tilastollisesti merkittäviä eroja eri käsittelyiden välillä, kuten ei myöskään monoterpeenien kohdalla. Seskviterpeenien ryhmässä oli havaittavissa lähes tilastollisesti merkitsevällä tasolla ($p = 0,061$) interaktio käsittelyiden välillä. Seskviterpeenien määrä oli keskimäärin alhaisempi kohotetussa lämpötilassa kuin kontrollilämpötilassa, mutta yhdessä kohotetun otsonin kanssa määrät kohosivat. Lämmitys- tai otsonikäsittely eivät vaikuttaneet tilastollisesti merkittävästi isopreenin tai GLV-yhdisteiden emissioihin. Ryhmäkohtaiset VOC-emissiot keskihajontineen on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 1. Kohotetulle otsonille ja kohotetulle lämpötilalle altistettujen kuusentaimien VOC-emissionopeudet ryhmittäin $\text{ng h}^{-1}\text{g(kp)}^{-1} \pm$ keskihajonta, $n = 4$.

| käsittely | kokonaisterpeenit | monoterpeenit | seskviterpeenit | GLV-yhdisteet ja metyylisalisylaatti | isopreeni |
|-----------|---------------------|---------------------|------------------|--|-------------------|
| AT + AO | 1280,1 \pm 1579,5 | 1229,6 \pm 1493,4 | 109,8 \pm 99,6 | 3,5 | 120,3 \pm 191,6 |
| ET + AO | 1170,7 \pm 1139,6 | 1145,9 \pm 1114,5 | 25,15 \pm 25,2 | 19,2 \pm 18,4 | 114,6 \pm 181,2 |
| AT + EO | 940,0 \pm 988,9 | 912,6 \pm 955,8 | 28,0 \pm 33,7 | 10,8 \pm 7,4 | 2,5 \pm 1,3 |
| ET + EO | 2431,0 \pm 2257,5 | 2378,9 \pm 2274,6 | 67,9v \pm 46,4 | 43,9 \pm 28,9 | 155,4 \pm 134,5 |

AT = vallitseva lämpötila ET = kohotettu lämpötila AO = vallitseva otsonipitoisuus EO = kohotettu otsonipitoisuus.

Tutkittavat yksittäiset GLV-yhdisteet olivat trans-2-heksenaali, cis-3-heksen-1-ol, 1-octen-3-oli, cis-3-heksenylasetaatti, nonanaali, cis-3-heksenyl isovaleraatti, metyyllisalisylaatti ja cis-3-hexenyl-tiglaatti. Kerätyistä näytteistä löytyi vain cis-3-heksenylasetaattia (löytyi 7 näytteestä) sekä metyyllisalisylaattia (9 näytteessä). Cis-3-heksenylasetaatin emissionopeudet vaihtelivat välillä 3,5 – 25,5 $\text{ng h}^{-1}\text{g(kp)}^{-1}$ ja metyyllisalisylaatin välillä 2,4 – 81,5 $\text{ng h}^{-1}\text{g(kp)}^{-1}$. Lämpötila- ja otsonikäsittelyt eivät aiheuttaneet metyyllisalisylaatin määrissä tilastollisesti merkittäviä muutoksia eikä käsittelyiden välillä ollut havaittavissa interaktioita. Cis-3-heksenylasetaatin tilastollinen testaus ei ollut käytettävillä menetelmillä mahdollista otoksen ollessa näin pieni.

Monoterpeeneistä tarkasteltiin yksittäisinä yhdisteinä trisykleeni, α -pineeni, α -phellandreeni, α -terpineeni, kamfeeni, p-kymeeni, sabineeni, β -pineeni, myrseeni, 3-kareeni, limoneeni, β -fellandreeni, 1,8-cineoli, γ -terpineeni, terpinoleeni, linalooli, kamphori, borneoli, terpinen-4-oli, α -terpineoli ja bornyyliasetaatti, sekä homoterpeeneihin kuuluva E-DMNT ((3E)-4,8-dimetyyli-1,3,7-nonatrieeni). Näistä runsaimmin indusoitui käsittelystä huolimatta kaikissa näytteissä α -pineenia, β -pineenia, myrseenia, 3-kareenia ja limoneenia (taulukko 2). Yhdestäkään näytteestä ei löytynyt E-DMNT:tä.

Monoterpeeneistä kamfeenilla oli lähes tilastollisesti merkittävä interaktio käsittelyjen välillä ($p = 0,082$). Kohotetussa lämpötilassa kamfeenipäästöt laskivat, mutta lisättäessä otsonikäsittely päästömäärät nousivat. α -pineenin määrä kasvoi lämmityskäsittelyssä lähes tilastollisesti merkitsevästi ($p = 0,089$), vastaavasti trisykleenillä päästöt laskivat lähes tilastollisesti merkitsevästi ($p = 0,084$) (taulukko 2).

Yksittäisistä seskviterpeeneistä tarkasteltiin longifoleeni, α -cubebeeni, longipineeni, trans- β -farneseeni, e-e- α -farneseeni, β -karyofylleeni, α -ylangeeni, cis- α -bisaboleeni, α -kopaeeni, α -humuleeni, longisykleeni, bourboneeni ja δ -kadineeni. Näistä α -cubaeenia, cis- α -bisaboleenia ja α -copaeenia löytyi vain muutamista näytteistä, eikä käsittelyiden vaikutusta voitu tutkia tilastollisesti käytettävissä olleella menetelmällä.

Trans- β -farneseenin tuotannossa käsittelyiden välillä oli havaittavissa interaktiota tilastollisesti merkitsevästi ($p = 0,014$). Lämpötilakäsittely vähensi päästöjä, mutta yhdessä otsonin kanssa trans- β -farneseenin tuotanto kasvoi. β -karyofylleenin tuotantoon sekä lämmityksellä ($p = 0,082$) että otsonin lisäyksellä ($p = 0,039$) havaittiin olevan tilastollisesti merkitsevä tai lähes merkitsevä vaikutus. Lämpötilan kohottaminen lisäsi yhdisteen tuotantoa, kun taas otsonipitoisuuden kohottamisella oli havaittavissa päinvastainen vaikutus (taulukko 2).

Taulukko 2. Kohotetulle otsonille ja kohotetulle lämpötilalle altistettujen kuusentaimien VOC-emissionopeudet yhdisteittäin $\text{ng h}^{-1}\text{g(kp)}^{-1} \pm$ keskihajonta, $n = 4$.

| | AT+AO | ET + AO | AT + EO | ET + EO |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| monoterpeenit | | | | |
| trisykleeni | $6,3 \pm 2,5$ | $4,6 \pm 1,3$ | $2,8 \pm 2,0$ | $4,1 \pm 2,0$ |
| α -pineeni | $138,8 \pm 122,2$ | $119,8 \pm 57,0$ | $50,9 \pm 32,4$ | $235,9 \pm 203,0$ |
| α -fellandreeni | $3,9 \pm 2,7$ | $2,4 \pm 2,1$ | $2,7 \pm 2,5$ | $3,3 \pm 2,1$ |
| α -terpineeni | $1,5 \pm 0,9$ | $1,7 \pm 1,5$ | $1,7 \pm 1,5$ | $1,4 \pm 0,4$ |
| kamfeeni | $43,8 \pm 27,3$ | $25,0 \pm 11,1$ | $23,5 \pm 7,8$ | $36,6 \pm 13,5$ |
| p-kymeeni | $2,5 \pm 1,6$ | $2,5 \pm 1,3$ | $3,3 \pm 1,8$ | $3,6 \pm 1,6$ |
| sabineeni | $11,9 \pm 7,7$ | $11,3 \pm 11,5$ | $10,2 \pm 12,8$ | $9,0 \pm 3,1$ |
| β -pineeni | $129,7 \pm 117,6$ | $109,7 \pm 59,5$ | $50,1 \pm 35,4$ | $214,7 \pm 222,3$ |
| myrseeni | $76,6 \pm 88,1$ | $80,1 \pm 59,6$ | $62,1 \pm 45,0$ | $141,4 \pm 100,8$ |
| 3-kareeni | $182,1 \pm 220,6$ | $164,6 \pm 210,7$ | $272,4 \pm 417,4$ | $72,5 \pm 69,1$ |
| limoneeni | $551,6 \pm 847,8$ | $482,0 \pm 680,4$ | $333,0 \pm 334,0$ | $1441,0 \pm 1767,0$ |
| β -fellandreeni | $61,9 \pm 85,4$ | $64,4 \pm 64,7$ | $29,6 \pm 23,2$ | $132,0 \pm 138,2$ |
| 1,8-cineoli | $21,3 \pm 21,2$ | $23,3 \pm 15,0$ | $10,1 \pm 3,9$ | $19,8 \pm 13,1$ |
| γ -terpineeni | $3,6 \pm 2,6$ | $4,7 \pm 2,9$ | $4,7 \pm 5,9$ | $2,5 \pm 0,5$ |
| terpinoleeni | $19,5 \pm 18,6$ | $17,7 \pm 23,8$ | $32,5 \pm 46,6$ | $14,9 \pm 4,1$ |
| linalooli | - | $8,1 \pm 2,6$ | $22,4 \pm 29,6$ | $22,4 \pm 14,3$ |
| kamphori | $5,3 \pm 3,5$ | $16,0 \pm 16,4$ | $6,7 \pm 4,8$ | $11,6 \pm 13,1$ |
| borneoli | 3,7 | $3,52 \pm 2,0$ | 2,9 | $7,30 \pm 2,4$ |
| terpinen-4-oli | - | 3,2 | - | 8,5 |
| α -terpineoli | - | $4,4 \pm 1,4$ | $3,7 \pm 2,2$ | $16,9 \pm 9,1$ |
| bornyyliasetaatti | $17,9 \pm 3,5$ | $8,6 \pm 2,8$ | $13,7 \pm 10,5$ | $14,8 \pm 9,7$ |
| seskviterpeenit | | | | |
| longifoleeni | $17,9 \pm 22,1$ | $5,2 \pm 6,5$ | $7,1 \pm 10,4$ | $13,3 \pm 21,0$ |
| α -cubebeeni | 7,3 | - | - | 1,1 |
| longipineeni | $39,1 \pm 32,8$ | $4,2 \pm 3,8$ | $8,2 \pm 11,7$ | $9,7 \pm 15,1$ |
| trans- β -farneseeni | 10,4 | $5,5 \pm 3,0$ | $6,4 \pm 4,7$ | $21,2 \pm 18,6$ |
| e-e- α -farneseeni | $7,8 \pm 9,7$ | $12,0 \pm 14,7$ | $4,3 \pm 3,0$ | $22,3 \pm 32,5$ |
| β -karyofylleeni | $4,6 \pm 4,5$ | $13,5 \pm 7,8$ | $1,1 \pm 0,7$ | $2,7 \pm 2,7$ |
| α -ylangeeni | $7,2 \pm 3,3$ | $3,1 \pm 1,7$ | 6,8 | 5,5 |
| cis- α -bisaboleeni | - | - | 1,6 | $5,1 \pm 3,0$ |
| α -kopaeeni | - | 0,8 | - | - |
| α -humuleeni | $3,5 \pm 3,4$ | $4,8 \pm 0,6$ | 1,2 | 2,6 |
| longisykleeni | $9,1 \pm 7,5$ | $2,4 \pm 0,5$ | $3,4 \pm 3,2$ | $4,4 \pm 4,9$ |
| β -bourboneeni | $8,1 \pm 7,6$ | $5,5 \pm 0,5$ | - | $5,3 \pm 6,1$ |
| δ -kadineeni | 1,0 | $1,0 \pm 1,0$ | 2,3 | $0,5 \pm 0,1$ |

Taulukossa – tarkoittaa, että yhdistettä ei löytynyt näytteestä. AT = vallitseva lämpötila ET = kohotettu lämpötila AO = vallitseva otsonipitoisuus EO = kohotettu otsonipitoisuus.

4.2 VALOMIKROSKOPIA

Neulasanatomian tulokset on esitetty taulukossa 3. Neulasen poikkileikkauksen pinta-ala laski lämmityskäsittelyssä keskimäärin 9,05 % ($p = 0,036$) ja hypodermikerros oheni 8,32 % ($p = 0,024$) verrattuna kontrollilämpötiläkäsittelyyn. Soluvälitilan osuus neulasen ylälaidalla taas kasvoi kohotetussa lämpötilassa 13,09 % ($p = 0,059$). Lisäksi lämmityskäsittelyllä oli havaittavissa lähes tilastollisesti merkitsevä vaikutus ($p = 0,078$) epidermikerroksen ohentueessa 1,47 %.

Otsonikäsittely lisäsi epidermikerroksen paksuutta tilastollisesti merkitsevästi sekä vaikutti lähes tilastollisesti merkitsevästi hypodermin paksuuteen. Epidermikerros paksuuntui 5,77 % ($p = 0,048$) ja hypodermi 6,15 % ($p = 0,083$). Käsittelyiden välillä ei ollut havaittavissa interaktioita. Käsittelyillä ei myöskään ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta pihkatiehyiden kokoon.

Taulukko 3. Kohotetun otsonin ja kohotetun lämpötilan vaikutukset neulasen ja pihkatiehyen pinta-alaan, epidermin ja hypodermin paksuuteen sekä soluvälitilan jakautumiseen neulasen yhteyttävän solukon ylä- ja alapuolella.

| käsittely | neulasen koko μm^2 | pihkatiehyen koko μm^2 | epidermin paksuus μm | hypodermin paksuus μm | soluvälitila yläpuoli (%) | soluvälitila alapuoli (%) |
|-----------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| AT + AO | 340497,7± 18233,6 | 5874,1± 1586,3 | 13,5 ± 1,3 | 12,5 ± 1,0 | 31,3 ± 5,2 | 36,0 ± 4,7 |
| ET + AO | 319581,8± 38005,5 | 4716,6± 1278,2 | 12,9 ± 0,4 | 11,8 ± 0,9 | 33,7 ± 4,8 | 36,3 ± 2,7 |
| AT + EO | 337673,1± 20488,9 | 4967,1± 633,8 | 14,7 ± 0,7 | 13,7 ± 1,1 | 31,0 ± 3,4 | 30,2 ± 5,1 |
| ET + EO | 289158,2± 35725,6 | 4216,0± 1272,4 | 13,7 ± 0,5 | 12,2 ± 0,7 | 38,0 ± 4,4 | 37,2 ± 12,5 |

AT = vallitseva lämpötila ET = kohotettu lämpötila AO = vallitseva otsonipitoisuus EO = kohotettu otsonipitoisuus.

4.3 PYYHKÄISYELEKTRONIMIKROSKOPIA

Lämmityskäsittely vähensi merkitsevästi ilmarakorivien määrää neulasessa (23%, $p = 0,042$) (taulukko 4). Ilmarakojen lukumäärässä $/\text{mm}^2$ oli havaittavissa lähes tilastollisesti merkitsevä käsittelyjen välinen interaktio ($p = 0,080$). Kohonnut otsonipitoisuus vähensi ilmarakojen lukumäärää $/\text{mm}^2$, mutta kohotettaessa samalla myös lämpötilaa ilmarakojen määrä kasvoi, määrän jäädessä kuitenkin vallitsevissa olosuhteissa kasvaneilta neulasilta saatuja tuloksia pienemmäksi.

Taulukko 4. Ilmarakorivien määrä neulasessa ja ilmarakojen lukumäärä $/\text{mm}^2 \pm$ keskihajonta.

| käsittely | ilmarakorivien lkm | ilmarakojen lkm/ mm^2 |
|-----------|--------------------|--------------------------------|
| AT + AO | $4,7 \pm 0,4$ | 166 ± 9 |
| ET + AO | $3,7 \pm 0,5$ | 149 ± 11 |
| AT + EO | $4,1 \pm 0,5$ | 143 ± 14 |
| ET + EO | $3,9 \pm 0,5$ | 149 ± 15 |

AT = vallitseva lämpötila ET = kohotettu lämpötila AO = vallitseva otsonipitoisuus EO = kohotettu otsonipitoisuus

5. TULOSTEN TARKASTELU

Kokeessa kohotetulla otsonilla saatu AOT40 kertymätaso 13481 ppb.h:ta ylitti yli kaksinkertaisesti Euroopan talouskomission UNECE:n määrittämän havupuille vaurioita aiheuttavan kertymätason 5000 ppb.h:ta vuonna 2010. Kohotetulle otsonipitoisuudelle altistuminen aiheutti muutoksia neulasanatomiaan sekä yksittäisten VOC-yhdisteiden emissioihin.

Lämmittimien avulla aikaansaatu lämpötilan kohotus jäi alhaisemmaksi kuin mitä arvioiden mukainen (IPCC 2007, Kellomäki ym. 2008) ilmaston lämpeneminen vuoteen 2100 mennessä tulisi varovaisimpienkaan arvioiden mukaan olemaan. Kuitenkin jo kokeessa saadulla 1,1 – 1,3 °C:en lämpötilakohotuksella oli havaittavissa tilastollisesti merkitseviä vaikutuksia sekä neulasanatomiaan että yksittäisten VOC-yhdisteiden emissionopeuksiin. Lämmitys- ja otsonikäsittelyiden välillä oli havaittavissa interaktioita muutamissa tutkituista tapauksissa.

5.1. VOC-YHDISTEET

Ryhmittäin (monoterpeenit, seskviterpeenit, GLV-yhdisteet + metyyllisalisylaatti ja isopreeni) tarkasteltuna otsonipitoisuuden tai lämpötilan kohottamisella ei havaittu tässä tutkimuksessa olleen vaikutusta VOC-yhdisteiden emissionopeuksiin. Runsaimmin emittoitui käsittelystä riippumatta α -pineenia, β -pineenia, myrseenia, sabineenia, 3-kareenia ja limoneenia, joiden on raportoitu aiemmin muodostavan suuren osan havupuiden emittoimista VOC-yhdisteistä (Hatfield & Huff Hartz 2011, Schönwitz ym. 1990). Yksittäisistä yhdisteistä lämmityskäsittely lisäsi α -pineenin emissionopeutta. Kyseisen yhdisteen emissionopeuksien on raportoitu aikaisemminkin lisääntyvän lämpötilan kohotuksen myötä ja α -pineenillä on arveltu olevan jonkinlainen suojaava rooli kuumuutta vastaan (Hartikainen ym. 2009). Koska α -pineeni on yksi eniten indusoituvista monoterpeeneistä, voi tällä olla merkittävä vaikutus ilmakehän fysiikkaan.

Trisykleenin emissionopeuksissa tapahtuneella 37 % vähennyksellä ei todennäköisesti ole yhtä suurta merkitystä ilmakehän kannalta, koska trisykleenin emissionopeudet ovat melko alhaisia esimerkiksi α -pineeniin verrattuna, jolloin trisykleenin emissionopeuden väheneminen ei riitä kompensoimaan α -pineenillä tapahtuvaa lisäystä. Kamfeenin emissionopeuksissa havaitulla käsittelyjen välisellä interaktiolla ei myöskään ole käytännön merkitystä ilmakehän fysiikan kannalta kamfeenin ollessa inertti (Hatfield & Huff Hartz 2011). Seskviterpeeneiden emissionopeuksissa näkyvä lämmityksen aiheuttama lähes tilastollisesti merkitsevä lisäys johtuu todennäköisesti trans- β -farneseenin emissionopeuden huomattavasta kiihtymisestä. Lämpötilan kohottamisella havaittaviin olevan emissioita lisäävä vaikutus myös β -karyofylleenin tuotannossa.

β -karyofylleeni on ilmakehään päätyessään yksi kaikkein reaktiivisimmista VOC-yhdisteistä rakenteessaan olevien kahden hiili-hiili –kaksoisidoksen vuoksi (Atkinson & Arey 2003). Molemmat näistä yhdisteistä toimivat ilmakehässä otsonin ja sekundaaristen orgaanisten aerosolien muodostumisen prekursoreina (Joutsensaari ym. 2005, Tarvainen ym. 2005), jolloin näiden kahden seskviterpeenien tuotannon lisääntymisellä voi olla hyvin merkittävä vaikutus ilmastollisesti. Otsonipitoisuuden kohoaminen näytti kuitenkin vähentävän β -karyofylleenin emissionopeutta, mikä voi kompensoida lämpötilan aiheuttamaa emissioiden kohoamista, vaikka käsittelyiden väliltä ei tällä kertaa löydettykään tilastollisesti merkittävällä varmuudella yhdysvaikutusta.

VOC-yhdisteiden kohdalla tulosten tarkasteluun käytetty keskiarvojen testaamisen käytetty SPSS mixed models ANOVA ei välttämättä ollut paras mahdollinen tilastollinen testi, sillä suuri vaihteluväli tuloksissa saattoi hankaloittaa tilastollisten merkitsevyyksien löytämistä. Esimerkiksi jokin trendit helpommin löytävä monimuuttuja-analyysi olisikin näin ollen voinut toimia ANOVAa paremmin tulosten tarkastelussa.

5.1.1 Mahdollisia virhelähteitä VOC-emissioiden määrittämisessä

VOC-yhdisteiden keräämisessä ja käsittelyssä mahdollisia virhelähteitä on useiden työvaiheiden vuoksi runsaasti. Mahdollisten keräysvälineistä irtoavien päästöjen vaikutus pyrittiin poistamaan nollanäytteiden avulla, mutta eroja saattoi syntyä taimien päälle kiinnitettyjen pussien tiiviyn vuoksi. Menetelmällä on käytännössä mahdotonta saada täysin vakioituja olosuhteita keräyspussin sisälle keräystä edeltävästä 15 minuutin huuhtelu- ja vakiointiajasta huolimatta pussin muodosta johtuen. Kulmien vuoksi keräyspussiin muodostui pakostakin pyörteilyä, jolloin osa VOC-yhdisteistä on saattanut kertyä kulmiin päätyttä keräimeen. Lisäksi pussien saaminen täysin ilmatiiveiksi kasvia vaurioittamatta oli käytännössä mahdotonta, jolloin hyvin pieni määrä kerättävästä taimesta indusoituneita VOC-yhdisteitä on saattanut vuotaa ulos ja toisaalta pussiin on voinut päästä ulkopuolelta muista lähteistä peräisin olevia VOCEja. Tätä pyrittiin ehkäisemään pitämällä tuloilman virttaausnopeus suurempana kuin poiston, jolloin pussissa vallitsi keräyksen ajan

pieni ylipaine. Todennäköisesti mahdollisissa vuodoissa liikkuneet VOC-määrät ovat olleet kuitenkin niin häviävän pieniä, ettei niillä ole ollut käytännössä merkitystä tulosten kannalta.

Lisäksi kiinnitysvaiheessa taimelle mahdollisesti tapahtuneet vauriot saattoivat aiheuttaa eroavaisuuksia keräyshetkellä VOC-yhdisteiden tuotannossa kasviyksilöiden välillä, sillä vaurion syntyminen tehostaa miltei välittömästi VOC-emissioita. Kenttäkokeita tehtäessä luonnonolot vaihtelevat aina eri kenttien välillä ja vaikka kentän vaikutus pyrittiinkin huomioimaan tilastollisissa analyysissä, kuuset olivat silti kasvaneet eri kentillä hieman erilaisissa valaistus- ja tuuliolosuhteissa. Keräyksen aikana lämpötila pussin sisällä nousi verrattuna ulkopuolelta mitattuun, mikä sekin on saattanut tehostaa hetkellisesti VOC-emissioita.

Keräyksessä käytetyt Tenax TA Carbopak –putket oli puhdistettu kaasukromatografimassaspektrometrillä 220 °C:ssa puhdistusohjelmalla ennen keräystä ja säilytetty +4 °C:ssa jääkaapissa, mutta puhdistuksen jäljiltä putkiin on saattanut mahdollisesti jäädä epäpuhtauksia. Putkiin oli voinut päästä muualta lähtöisin olevia VOC-yhdisteitä putkien käsittelyn huolellisuudesta huolimatta. Yksi hyvin todennäköinen päästölähde oli Snellmania-rakennuksen neljännessä kerroksessa kesällä 2010 suoritettujen korjaustyöjen aikana. Ainakin näissä korjaustöissä käytetyistä kemikaaleista lähtöisin olleita ei-tutkittaviin yhdisteisiin kuuluvia VOC-yhdisteitä oli havaittavissa näytteissä tuloksia tarkasteltaessa. Lisäksi ajossa kolonnista itsestään saattoi irrota epäpuhtauksia varsinkin ajon loppuvaiheessa. Osittain hajonneiden, painavimpien yhdisteiden hiilirunkoja saattoi tulla detektorille vielä ajon loppuvaiheessa.

Varsinaisessa kaasukromatografimassaspektrometrijossa osa yhdisteistä näytti hajonneen ajon aikana ja antavan näin tunnistesignaalin samalle ionille useammassa aikapisteessä. Lisäksi hyvin pienten yhdistemäärien kohdalla vaadittua 90% tunnistustarkkuutta oli hyvin vaikea saavuttaa. Data analysis –ohjelmalla saatiin tunnistettua suoraan suurin osa ja näiden kohdalla ohjelma suoritti alkuperäisten pitoisuuksien määrittämisen standardin perusteella, mutta osa näytteistä löytyneistä yhdisteistä jouduttiin manuaali-integroimaan ja laskemaan käsin. Jotta manuaali-integroinnilla saadut tulokset olisivat olleet keskenään vertailukelpoisia, työn suoritti yksi ihminen, jolloin

kromatogrammin antamien signaalipiikkien aloitus- ja lopetuskohtien valinta eri näytteiden välillä tapahtui aina samalla tavalla.

Kun taimet irrotettiin biomassamäärittäystä varten elokuussa, osa vanhemmista neulasvuosikerroista varisi, jolloin kaikkia VOC-keräyksessä mukana olleita neulasia ei saatu mukaan biomassamäärittelyyn. Tällöin vanhempien vuosien osalta neulasbiomassa ei välttämättä täysin vastannut todellisuutta. Yksittäisten neulasten vähäisen massan vuoksi tällä tuskin oli suurta merkitystä kokonaiskuivabiomassoja punnittaessa. Lisäksi varisseet neulaset olivat jo keräyshetkellä huonokuntoisempia, eivätkä todennäköisesti olleet keräyksessä lisänneet VOC-emissioita merkittävässä määrin.

5.2. NEULASANATOMIA

Neulasissa tapahtuneet muutokset osoittivat jo muutaman asteen lämpötilan kohottamisella olevan tilastollisesti merkitseviä vaikutuksia kuusen neulasiin. Neulasen koon pieneneminen voi viitata alentuneeseen fotosynteesitasoon ja sitä kautta heikentyneeseen kasvuun. Aikaisemmissa tutkimuksissa kohonneen lämpötilan on havaittu vähentävän kuusen biomassatuotantoa (Kellomäki ym. 2008), mikä voisi selittyä osaltaan pienempien neulasten vuoksi vähentyneellä neulasbiomassan osuudella. Hypodermin ja epidermin oheneminen sekä muutos soluvälitilan osuuden lisääntymisenä neulasen ylälaidalla ovat yleensä niin sanotun mesomorfisen rakenteen tunnusmerkkejä, joka on yleinen lämpimässä kasvaneilla, hyviin vesiolosuhteisiin tottuneilla kasveilla. Mesomorfisilla kasveilla lehden tai neulasen uloimmissa solukerroksissa tapahtuu muutoksia ja pintavahakerros eli kutikula ohenee ja jopa sen koostumus voi muuttua, jolloin kasvi voi pitää ilmarakojaan enemmän suljettuna ja kaasunvaihtoa tapahtuu suoraan lehden pinnalta soluvälien kautta. Samalla veden haihtuminen pinnalta lisääntyy (Carreto ym. 2002). Kokeessa olleilla kuusilla anatomiset muutokset eivät kuitenkaan olleet näin voimakkaaseen mesomorfisen rakenteen muuttumiseen viittaavia. Epidermin ohenemista on aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu ainakin kohotetussa lämpötilassa kasvaneella haavalla (Hartikainen ym. 2009). Vastaavasti kohotetussa otsonikäsittelyssä epidermi- ja hypodermikerrokset paksuntuivat, mikä voi viitata jonkinlaisen suojarakenteen kehittymiseen.

IR-lämmittimiä käytettäessä neulasen lämpötilaa kohottavan vaikutuksen on havaittu olevan suurempi kuivastressistä kärsineillä kasveilla kuin riittävässä vesioloissa kasvavilla (De Boeck & Nijs 2011). Kastelun avulla ehkäistiin kuivastressin muodostuminen, mutta luonnollisessa ympäristössä kohonneen lämpötilan seurauksena muodostunut mesomorfisempi rakenne voi tehdä kuusen herkemmäksi kuivuusstressille. Euroopan alueella vuotuiset sademäärät ovat viime vuosina lisääntyneet (IPCC 2007). Suomessa iso osa vuotuisesta sadannasta tulee lumena, jolloin vesi ei ole suoraan kasvien käytettävissä. Lisäksi kuivien jaksojen esiintyminen tulee arvioiden mukaan lisääntymään tulevaisuudessa (IPCC 2007). Lämpenemisen vuoksi veden haihdunta kasveista voimistuu, jolloin mahdollisesti lisääntyvien sateiden hyöty kasveille voi jäädä vähäiseksi. Lisäksi mikäli suojaava kutikula ohenee, voi kuusen vastustuskyky erilaisia patogeeneja vastaan heikentyä (Carreto ym. 2002).

Ilmarakorivien määrän väheneminen voi olla suoraa seurausta kohotetun lämpötilan aiheuttamasta neulasen koon pienentymisestä. Ilmarakojen määrän vähenemisellä ei tässä tutkimuksessa ollut vaikutusta kasvin tuottamiin VOC-emissionopeuksiin. Tämä saattoi selittyä osaltaan sillä, että ilmarakojen tiheydessä tapahtunut tilastollisesti merkittävällä varmuudella muutoksia, vaan niiden määrät pysyivät ilmarakorivien vähenemisestä huolimatta lähes samana eri käsittelyissä.

5.2.1 Mahdollisia virhelähteitä mikroskopiaan liittyen

Pyyhkäisyelektronimikroskooppitarkastelua varten kuivatuista näytteistä valittiin satunnaisesti viisi neulasta, jotka saattoivat edustaa taimen ylä- tai alaoksia tai neulasia rangan valo- tai varjopuolelta. Ainoastaan neulasen ikä oli vakio kaikissa kuvatuissa ja analysoiduissa näytteissä. Olosuhteiden eroavaisuuksien vuoksi rangan ylä- ja alapuolen neulasissa esiintyy todennäköisesti jonkin verran vaihtelua. Tätä vaihtelua pyrittiin tasoittamaan valitsemalla jokaisesta näytteestä useampi neulanen, mutta keskinäisellä vaihtelulla on saattanut silti olla merkitystä ilmarakojen määriä tarkasteltaessa.

Monivaiheisessa valomikroskooppinäytteiden valmistelussa inhimillisten virheiden todennäköisyyttä ei voi jättää huomiotta. Preparaatteja valmistettaessa leikkeisiin on voinut tulla vaurioita jos solun osat ovat muuttaneet järjestäytymistään reagenssien, kemikaalien, työtapojen tai leikkaamisen vuoksi (Maunsbach & Afzelius 1999). Joihinkin leikkeistä ei ollut osunut ollenkaan pihkatiehyitä tai pihkatiehyestä näkyi vain kapeneva pääty, jolloin tiehyen läpimitan määrittämisessä tulokset eivät olleet keskenään täysin vertailukelpoisia. Useampien näytteiden mukanaolo parantaa virhetarkkuutta, mutta tämäkin on yksi huomioitava tekijä tilastollisten tulosten luotettavuutta arvioitaessa. VM-näytteistä otettujen kuvien laatu vaihteli, osa oli epätarkempia, joten sekin on voinut aiheuttaa jonkin verran virhettä analysointivaiheessa.

6. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tulosten perusteella pitkäkestoinen kohotus lämpötilassa aiheuttaa muutoksia neulasen anatomiaan jo eron ollessa vain reilu aste verrattuna vallitsevaan ilman lämpötilaan. Neulasissa tapahtuneiden rakennemuutosten perusteella kaksi vuotta kestänyt altistus riittää aiheuttamaan nuorilla kuusentaimilla sopeutumia uudenaalisiin lämpötilaolosuhteisiin. Suojaavien hypodermi- ja epidermikerrosten oheneminen voi jatkossa johtaa alentuneeseen stressinsietokykyyn esimerkiksi UV-säteilyä tai kuivuutta vastaan. Soluvälitilan osuuden kasvu yläpuolella edesauttaa kaasujen virtausta ja haihtumista, joilla kasvi voi jossain määrin säädellä lämpötilaa lehdissään tai neulasissaan. Kasville voi olla kannattavaa säilyttää sama fotosynteesin kannalta tärkeiden mesofyllisolujen tiheys neulasen suojaisammalla alapuolella. Kohotettu otsonipitoisuus paksunsi sekä epidermiä että hypodermia, mikä voi viitata suojarakenteen muodostumiseen.

Kokeessa 1,3 – 1,4 –kertaisella otsonialtistuksella ei havaittu olevan tilastollisesti merkitsevää vaikutusta VOC-yhdisteiden kokonaismääriin. Seskviterpeenien emittoitumisessa oli havaittavissa nousua käsittelyistä johtuen, sekä interaktioita käsittelyjen välillä. Trans- β -farneseeni ja β -karyofylleeni ovat voimakkaan reaktiivisia otsonin prekursoreita ja näin ollen lisäyksellä näiden emissioissa voi olla selkeä vaikutus ilmakehässä (Atkinson & Arey 2003). Emittoituneiden määrien

vaihtelu oli näytteiden välillä erittäin suurta, johtuen osittain puiden geneettisestä vaihtelusta. Yksittäisten yhdisteiden määrissä oli havaittavissa käsittelyiden aiheuttamia muutoksia, käytännössä merkitys ilmakehän fysiikalle vaihtelee yhdisteen reaktiivisuuden mukaan (Atkinson & Arey 2003). Tulosten perusteella nuoret kuusentaimet vaikuttavat kuitenkin varsin kestäville otsonia vastaan jopa pitkälti yli 5000 ppb.h kertymätasolla, jota pidetään havupuilla vaurioita aiheuttavan kertymätason rajana.

LÄHTEET

- Aaltonen, H; Pumpanen, J; Pihlatie, M; Hakola H; Hellén, H; Kulmala, L; Vesala, T. and Bäck, J: 2011. Boreal pine forest floor biogenic volatile organic compound emissions peak in early summer and autumn (Agricultural and Forest Meteorology 151:682-691)
- Andersson, C. ja Engardt, M. 2010. European ozone in future climate: Importance of changes in dry deposition and isoprene emissions (Journal of Geophysical Research vol. 115, D.02303, doi:10. 1029/2008JD011690)
- Anttonen, S. 1996. Impacts of ozone and other air pollutants on pine needle lipids - microscopical and chemical studies (Doctoral dissertation, Kuopion yliopisto)
- Atkinson, R. ja Arey, J. 2003 Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review (Atmospheric Environment 37:197-219)
- de Boeck, H.J. ja Nijs, I.: 2011. An alternative approach for infrared heater control in warming and extreme event experiments in terrestrial ecosystems (Journal of Ecology 99:724-728)
- Calfapietra, C.; Fares, S. ja Loreto, F. 2009. Volatile organic compounds from Italian vegetation and their interaction with ozone (Environmental Pollution 157:1478-1486)
- Carreto, L.; Almeida, A.R.; Fernandes, A.C. ja Vaz, W.C. 2002. Thermotropic Mesomorphism of a Model System for the Plant Epicuticular Wax Layer (Biophysical Journal, 82:530-540)
- Constable, J.V.H.; Litvak, M.E.; Greenberg, J.P. ja Monson, R.K. 1999. Monoterpene emission from coniferous trees in response to elevated CO₂ concentration and climate warming (Global Change Biology 5:255-267)
- Denby, B.; Sundvor, I.; Cassiani, M.; de Smet, P.; de Leeuw, F. ja Horalék, J. 2010. Spatial mapping of ozone and SO₂ trends in Europe (Science of the Total Environment 48:4795-4806)
- European Environmental Agency Assessment of ground-level ozone in EEA member countries, with a focus on long-term trends. Technical Report 7/2009 ISSN 1725-2237
- Engardt, M.; Bergström, M. ja Andersson, C. 2009. Climate and emission changes contributing to changes in near-surface ozone in Europe over the coming decades: Results from model studies (Ambio 38:452-458)
- Filella, I.; Wilkinson, M.J.; Llusià, J.; Hewitt, C.N. ja Peñuelas, J. 2007. Volatile organic compounds emissions in Norway spruce (*Picea abies*) in response to temperature changes (Physiologia Plantarum 130:58-66)
- Forest.fi, Suomen Metsäyhdistyksen www-sivut 11.1.2012
<http://www.forest.fi/smyforest/forest.nsf/0/BE3C5576C911F822C2256F3100418AFD?Opendocument>

- Ghirardo, A.; Koch, K.; Taipale, R.; Zimmer, I.; Schnitzler, J-P. ja Rinne, J. 2010. Determination of *de novo* and pool emissions of terpenes from four common boreal/alpine trees by $^{13}\text{C}_2$ labelling and PTR-MS analysis (Plant, Cell and Environment 33:781-792)
- Goldstein, A.H. and Galbally, I.E: 2007. Known and Unexplored Organic Constituents in the Earth's Atmosphere (Environmental Science & Technology 41:1515-1521)
- Guenther, A: 1997. Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions (Ecological Applications 7:34-45)
- Guenther, A.B; Zimmerman, P.R; Harley, P.C; Monson, R.K. and Fall, R: 1993. Isoprene and Monoterpene Emission Rate Variability: Model Evaluations and Sensitivity Analyses (Journal of Geophysical Research 98:12609-12617)
- Hakola, H; Tarvainen, V; Bäck, J; Bonn, B; Rinne, J. and Kulmala, M: 2006. Seasonal variation of mono- and sesquiterpene emission rates of Scots pine (Biosciences 3: 93-101)
- Hartikainen, K.; Nerg, A-M.; Kivimäenpää, M.; Kontunen-Soppela, S.; Mäenpää, M.; Oksanen, E.; Rousi, M. ja Holopainen, T. 2009. Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and and temperature (Tree Physiology 29:1163-1173)
- Hatfield, M.L. ja Huff Hartz, K.E. 2011. Secondary organic aerosol from biogenic volatile organic compound mixtures (Atmospheric Environment 45:2211-2219)
- Ilmatieteen laitos, Finnish Meteorological Institution, <http://ilmatieteenlaitos.fi/kasvukausi-2010>
- Intergovernmental Panel of Climate Change, IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change 2007. http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_and_data_reports.shtml#T895FrB1CSY
- Joutsensaari, J.; Loivamäki, M.; Vuorinen, T.; Miettinen, P.; Nerg, A-M.; Holopainen, J.K. ja Laaksonen, A. 2005. Nanoparticle formation by ozonolysis of inducible plant volatiles (Atmospheric Chemistry and Physics 5:1489-1495)
- Kellomäki, S.; Peltola, H.; Nuutinen, T; Korhonen, K.T. ja Strandman, H. 2008. Sensitivity managed boreal forests in Finland to Climate Change, with implications for adaptive management (Philosophical Transactions of the Royal Society B 636:2341-2351)
- Kesselmeier, J. and Staudt, M: 1999. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology (Journal of Atmospheric Chemistry 33:23-88)
- Kivimäenpää, M. 2003. The cell and tissue structures of Norway spruce and Scots pine needles as tools fo the diagnosis of ozone impact (Doctoral dissertation, Kuopion yliopisto)
- Kivimäenpää, M.; Sutinen, S.; Calatayud, V. ja Jose Sanz, M. 2010. Visible and microscopic needle alterations of mature Aleppo pine (*Pinus halepensis*) trees growing on an ozone gradient in eastern Spain (Tree Physiology 30:541-554)

- Klingenberg, J.; Engardt, M.; Uddling, J.; Karlsson, P.E. ja Pleijel, H. 2010. Ozone risk for vegetation in future climate of Europe based on stomatal ozone uptake calculations (Tellus)
- Laffineur, Q; Aubinet, M; Schoon, N; Amelynck, C; Müller, J-F; Dewulf, J; van Langenhove, H; Steppe, K; Šimpraga, M. and Heinesch, M: 2011. Isoprene and monoterpene emissions from a mixed temperate forest (Atmospheric Environment 45:3157-3168)
- Langebartels, C.; Wohlgemuth, H.; Ksieschan, S.; Grün, S. ja Sandermaan, H. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone exposed plants (Plant Physiology and Biochemistry, 40:567-575)
- Laurila, T.; Hakola, H.; Lindfors, V.; Meinander, O.; Puhto, K. ja Jokela, V. 1999. Ozone, VOC and Nitrogen Species Concentrations in Ambient Air in the Boreal Region of Europe (European Commission: Biogenic VOC emissions and photochemistry in the boreal regions of Europe - Biphorep, s. 81-100)
- Long, S.P. ja Naidu, S.L. 2002. Effects of oxidants at the biochemical, cell and physiological levels, with particular reference to ozone (Air Pollution and Plant Life, toim. Bell, J.N.B. ja Treshow, M. John Wiley & Sons, Chichester; 69-88)
- Luomala, E-M.; Laitinen, K.; Sutinen, S.; Kellomäki, S. ja Vapaavuori, E. 2005. Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature (Plant, Cell and Environment, 28:733-749)
- Maunsbach, A.B. ja Afzelius, B.A. 1999. Biomedical electron microscopy. Illustrated methods and interpretations (Academic Press, San Diego, London)
- Metsäntutkimuslaitos Metla <http://www.metla.fi/tiedotteet/2010/2010-06-22-VMI-tiedote.htm>, päivitetty 23.7.2010
- Mäenpää, M.; Riikonen, J.; Kontunen-Soppela, J.; Rousi, M. ja Oksanen, E. 2011. Vertical profiles reveal impact of ozone and temperature on carbon assimilation of *Betula pendula* and *Populus tremula* (Tree Physiology, 31:808-818)
- Palomäki, V.; Laitinen, K.; Holopainen, T. ja Kellomäki, S. 1996. First-year results on the Effects of Elevated atmospheric CO₂ and O₃ concentrations on needle ultrastructure and gas exchange responses of Scots pine saplings (Silva Fennica 30:123-134)
- Rinnan, R.; Rinnan, Å.; Holopainen, T.; Holopainen, J.K. ja Pasanen, P. 2005. Emission of non-methane organic compounds (VOCs) from boreal peatland microcosms – effects of ozone exposure (Atmospheric Environment 39:921-930)
- Räisänen, T., Ryyppö, A. ja Kellomäki, S. 2008. Effects of elevated CO₂ and temperature on monoterpene emission of Scots pine (*Pinus sylvestris* L) (Atmospheric Environment, 42:4160-4171)

- Sallas, L.; Luomala, E-M.; Utriainen, J.; Kainulainen, P. ja Holopainen, J.K. 2003. Contrasting effects of elevated carbon dioxide concentration and temperature on Rubisco activity, chlorophyll fluorescence, needle ultrastructure and secondary metabolites on conifer seedlings (Tree Physiology 23:97-108)
- Sandermann Jr., H. 1996. Ozone and plant health (Annual Review of Phytopathology, 34:347-366)
- Schönwitz, R.; Lohwasser, K.; Kloos, M. ja Ziegler, H. 1990. Seasonal variation in the monoterpenes in needles of *Picea abies* (L.) Karst. (Trees 4:34-40)
- Sutinen, S.; Skärby, L.; Wallin, G. ja Selldén, G. 1990. Long-term exposure of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., to ozone in open-top chambers II. Effects on the ultrastructure of needles (New Phytologist 115:345-355)
- Tarvainen, V.; Hakola, H.; Hellén, H.; Bäck, J.; Hari, P. ja Kulmal, M. 2005. Temperature and light dependence of the VOC emissions of Scots pine (Atmospheric Chemistry and Physics, 5:989-998)
- Wieser, G.; Matyssek, R.; Luzian, R.; Zwerger, P.; Pindur, P.; Oberhuber, W. ja Gruber, A. 2009. Effect of atmospheric and climate change at the timberline of the Central European Alps (Annual Forest Science, 66(204): 12 sivua)
- Wittig, V.E.; Ainsworth, E.A.; Naidu, S.L.; Karnosky, D.F. ja Long, S.P. 2009. Quantifying the impacts of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis (Global Change Biology 15:396-424)

Liite 1. GLV-standardissa käytetyt yhdisteet sekä metyyllisalisylaatti ja niiden pitoisuudet kantaliuoksessa, valmiiksi laimennetussa ajoliuoksessa (ng/μl) sekä standardissa käytetyssä 2 μl:n tilavuudessa.

| Yhdiste | Punnittu kantaliuokseen (mg/100 ml) | Pitoisuus ajoliuoksessa (ng/μl) | 2 μl standardia sisältää (ng) |
|-----------------------------------|--|--|--|
| cis-3-heksen-1-oli | 44,7 | 44,7 | 89,4 |
| trans-2-heksenaali | 44,5 | 44,5 | 89,0 |
| 1-heksanoli | 46,9 | 46,9 | 93,8 |
| 1-octen-3-oli | 43,1 | 43,1 | 86,2 |
| cis-3- heksenyyliasetaatti | 47,2 | 47,2 | 94,4 |
| 1-kloorioktaani | 42,0 | 42,0 | 84,0 |
| nonanaali | 45,4 | 45,4 | 90,8 |
| cis-3-heksenyyli butyraatti | 48,5 | 48,5 | 97,0 |
| metyyllisalisylaatti | 58,0 | 58,0 | 116,0 |
| cis-3-heksenyyli isovaleraatti | 45,0 | 45,0 | 90,0 |
| cis-3-heksenyyli tiglaatti | 47,0 | 47,0 | 94,0 |

Liite 2. Terpenoidistandardissa käytetyt yhdisteet ja niiden pitoisuudet kantaliuoksessa, valmiiksi laimennetussa ajoliuoksessa (ng/μl) sekä standardissa käytetyssä 2 μl:n tilavuudessa.

| Yhdiste | Punnittu kantaliuokseen (mg/100 ml) | Pitoisuus ajoliuoksessa (ng/μl) | 2 μl standardia sisältää (ng) |
|--------------------|---|---------------------------------------|----------------------------------|
| trisykleeni | 41,8 | 41,8 | 83,6 |
| α-pineeni | 47,1 | 47,1 | 94,2 |
| kamfeeni | 41,6 | 41,6 | 83,2 |
| sabineeni | 43,8 | 43,8 | 61,4 |
| β-pineeni | 43,7 | 43,7 | 87,4 |
| myrseeni | 44,0 | 44,0 | 88,0 |
| 3-kareeni | 43,4 | 43,4 | 86,8 |
| limoneeni | 44,5 | 44,5 | 89,0 |
| 1,8-cineoli | 44,9 | 44,9 | 89,8 |
| 1-kloorioktaani | 44,6 | 44,6 | 89,2 |
| γ-terpineeni | 41,8 | 41,8 | 83,6 |
| terpinoleeni | 41,7 | 41,7 | 83,4 |
| linalooli | 43,8 | 43,8 | 87,6 |
| E-DMNT | 40,3 | 40,3 | 80,6 |
| kamphori | 46,1 | 46,1 | 92,2 |
| borneoli | 41,2 | 41,2 | 82,4 |
| terpinen-4-oli | 46,0 | 46,0 | 92,0 |
| α-terpineoli | 39,2 | 39,2 | 78,4 |
| bornyyliasetaatti | 49,0 | 49,0 | 98,0 |
| longifoleeni | 48,2 | 48,2 | 96,4 |
| trans-β-farneseeni | 39,5 | 39,5 | 79,0 |
| α-humuleeni | 46,8 | 46,8 | 93,6 |
| δ-kadineeni | 53,4 | 53,4 | 106,8 |